

**Charakterisierung der *Paenibacillus larvae* Genotypen ERIC I-V und alternative  
Therapieverfahren zur Behandlung der Amerikanischen Faulbrut**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften

der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades

eines Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

**D i s s e r t a t i o n**

von Hannes Beims  
aus Braunschweig

1. Referent: Prof. Dr. M. Steinert

2. Referent: Prof. Dr. M. Vences

eingereicht am: 06.06.2018

mündliche Prüfung (Disputation) am: 12.07.2018

Druckjahr 2018

## Veröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor dieser Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### **Publikationen**

Sood S, Steinmetz H, **Beims H**, Mohr KI, Stadler M, Djukic M, von der Ohe W, Steinert M, Daniel R, Müller R. 2014. Paenilarvins, iturin family lipopeptides from the honey bee pathogen *Paenibacillus larvae*. *Chembiochem* 15(13):1947-55.

**Beims H**, Wittmann J, Bunk B, Spröer C, Rohde C, Günther G, Rohde M, von der Ohe W, Steinert M. 2015. *Paenibacillus larvae*-directed bacteriophage HB10c2 and its application in American Foulbrood-affected honey bee larvae. *Appl Environ Microbiol* 81(16): 5411-19.

**Beims H**, Steinert M, von der Ohe W. 2016. Bakterienfresser – Der Faulbruterreger hat auch natürliche Feinde im Bienenvolk. *Deutsches Bienenjournal* 24(3):16.

**Beims H**. 2016. Paenilarvin. *Deutsches Bienenjournal* 24(3):24.

Vosloo JA, **Beims H**, Allsopp MH, van Rensburg W, von der Ohe W, Steinert M, Rautenbach M. 2017. Tolerance of honey bee adults and larvae towards tyrothricin peptides from *Brevibacillus parabrevis*. *Apidologie* 48(6):833-844.

### **Tagungsbeiträge**

**Beims H**, Ochmann SE, Günther G, Hu Q, von der Ohe W, Steinert M. Antimicrobial compounds from *Paenibacillus larvae* and their potential role in pathogenicity. 61. Tagung der Arbeitsgemeinschaft der Institute für Bienenforschung e.V. Marburg 2014.

**Beims H**, Wittmann J, Bunk B, Spröer C, Rohde C, Rohde M, von der Ohe W, Steinert M. The use of bacteriophages to fight against American Foulbrood. 62. Tagung der Arbeitsgemeinschaft der Institute für Bienenforschung e.V. Münster 2015.

**Beims H**, Schaab K, Günther G, Mohr KI, von der Ohe W, Steinert M. Detection of iturins Paenilarvin A-C from *Paenibacillus larvae*. 63. Tagung der Arbeitsgemeinschaft der Institute für Bienenforschung e.V. Braunschweig 2016.

**Beims H**, Wittmann J, Bunk B, Spröer C, Rohde C, Rohde M, von der Ohe W, Steinert M. Characterization and use of bacteriophages to fight against American Foulbrood. 64. Tagung der Arbeitsgemeinschaft der Institut für Bienenforschung e.V. Celle 2017.

**Beims H**, von der Ohe W, Steinert M. *Paenibacillus larvae* – Bienenpathogen und Antibiotikaproduzent. Jahrestagung der Gesellschaft der Freunde des LAVES – Inst. f. Bienenkunde Celle e.V. Celle 2014.

**Beims H**, Wittmann J, Rohde C, von der Ohe W, Steinert M. Neue Strategien im Kampf gegen die AFB. Jahrestagung der Gesellschaft der Freunde des LAVES – Inst. f. Bienenkunde Celle e.V. Celle 2015.

**Beims H**, Wittman J, Rohde C, Rohde M, Mohr KI, Sood S, von der Ohe W, Steinert M. Amerikanische Faulbrut – Aktuelles aus unserer Forschung. Jahrestagung der Gesellschaft der Freunde des LAVES – Inst. f. Bienenkunde Celle e.V. Celle 2016.

**Beims H**, Vosloo JA, von der Ohe W, Steinert M. Tyrothricin und seine biologische Aktivität in der Honigbiene. Jahrestagung der Gesellschaft der Freunde des LAVES – Inst. f. Bienenkunde Celle e.V. Celle 2017.

**Beims H**, von der Ohe W, Steinert M. Antimicrobial compounds from *Paenibacillus larvae* & new therapeutic strategies. 1. MINAS Symposium. Burg Warberg 2013.

**Beims H**, Ochmann SE, von der Ohe W, Steinert M. Antimicrobial compounds from the honey bee pathogen *Paenibacillus larvae* and their potential role in pathogenicity. 2. MINAS Symposium. Hannover 2014.

**Beims H**, Sood S, Mohr KI, von der Ohe W, Steinert M. Paenilarvins, iturin family lipopeptides from *Paenibacillus larvae* and their potential role in pathogenicity. 3. MINAS Symposium. Burg Warberg 2014.

**Beims H**, Sood S, Mohr KI, von der Ohe W, Steinert M. NRPs in virulence in *Paenibacillus larvae*. 4. MINAS Symposium. Burg Warberg 2015.

**Beims H**, Bunk B, Spröer C, Wittmann J, Rohde C, Rohde M, Mohr KI, von der Ohe W, Steinert M. NRPs in virulence in *Paenibacillus larvae*. 4. MINAS Symposium. Burg Warberg 2016.

**Beims H**. Bacteriophage application in honeybees infected with *Paenibacillus larvae*. 1<sup>st</sup> German Phage Symposium. Hohenheim 2017.



## Danksagung

Bei Herrn PROF. DR. MICHAEL STEINERT möchte ich mich für die Möglichkeit zur Bearbeitung dieses äußerst spannenden Projektes und die hervorragende Betreuung, sowie das offene Ohr bei Fragestellungen während dieser Arbeit bedanken.

Herrn PROF. DR. MIGUEL VENCES danke ich für die Übernahme des 2. Referates der Dissertation und seine inspirativen vorschläge zur erweiterung dieses spannenden Forschungsgebietes.

Herrn PROF. DR. STEFAN SCHULZ danke ich für die Aufnahme des Projektes in das Graduiertenkolleg MINAS, die weiterführenden Ideen und seine Mitarbeit in der Prüfungskommission.

Für die ansteckende Begeisterung an der Phagenthematik und Phagenforschung möchte ich mich bei DR. CHRISTINE ROHDE, DR. JOHANNES WITTMANN und PROF. DR. MANFRED ROHDE bedanken.

Den Mitarbeitern des LAVES – Institut für Bienenkunde Celle danke ich für die fachliche Beratung im Umgang mit *Apis mellifera* und *Paenibacillus larvae*, sowie die Bereitstellung der verwendeten Versuchsbienenvölker. Mein besonderer Dank gilt hierbei Dr. WERNER VON DER OHE. Weiterhin MARTINA JANKE, DOROTHEE LÜKEN und FRIEWI LINAU.

Für das Korrekturlesen meiner Arbeit möchte ich mich bei GABI GÜNTHER und DR. JANINE RASCH bedanken.

Während der gesamten Arbeitszeit in Braunschweig fühlte ich mich stets gut betreut und konnte mich jederzeit mit Fragen an andere Mitglieder der gesamten Arbeitsgruppe wenden. Für dieses hervorragende Arbeitsklima möchte ich mich bei der gesamten AG Steinert bedanken! Für die ansteckende Begeisterung und die vielen Lebensweissheiten bedanke ich mich beim ZdM, mit dem auch außerhalb des Labors die Arbeit nie ganz zum ruhen kam und fremde Städte, Länder und andere Anlaufpunkte entdeckt wurden.

## Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	9
2	Summary.....	10
3	Einleitung.....	11
3.1	Die westliche Honigbiene – <i>Apis mellifera</i> .....	11
3.1.1	Lebenszyklus der Arbeiterin .....	11
3.1.2	Abwehrmechanismen der Biene gegenüber Infektionskrankheiten.....	12
3.2	Amerikanische Faulbrut – <i>Paenibacillus larvae</i> .....	13
3.2.1	Genotypen von <i>P. larvae</i> .....	13
3.2.2	Pathogenese und Virulenzfaktoren von <i>P. larvae</i> .....	14
3.2.3	Nachweis von AFB-Infektionen .....	15
3.2.4	Vorgehensweisen bei AFB-Infektionen.....	16
3.3	Europäische Faulbrut – <i>Melissococcus plutonius</i> .....	17
3.3.1	Kommensale Erreger der EFB .....	18
3.3.2	Vorgehensweise bei EFB-Ausbrüchen .....	18
3.4	Zielsetzung der Arbeit .....	19
4	Material und Methoden.....	20
4.1	Geräte.....	20
4.2	Verbrauchsmaterialien.....	21
4.3	Bakterienstämme, Bakteriophagen, Bienenvölker .....	21
4.4	Vektoren, Enzyme, Primer, Marker, Lösungen und Medien für die Zellbiologie.....	23
4.5	Bakteriologische Methoden .....	26
4.5.1	Isolation und Identifizierung von <i>P. larvae</i> .....	26
4.5.2	Kultivierung von Bakterien.....	27
4.5.3	Kryokonservierung von Bakterien .....	28
4.5.4	Herstellung von <i>P. larvae</i> -Sporen.....	28
4.5.5	Reisolation von <i>P. larvae</i> aus infizierter Bienenbrut.....	28
4.5.6	Präparation von <i>P. larvae</i> für die Elektronenmikroskopie .....	28
4.5.7	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen .....	29
4.5.8	Herstellung von <i>B. megaterium</i> -Protoplasten .....	29
4.5.9	Herstellung von <i>P. larvae</i> -Protoplasten .....	30
4.6	Virologische Methoden .....	30
4.6.1	Isolation und Nachweis <i>P. larvae</i> -spezifischer Bakteriophagen .....	30
4.6.2	Vermehrung und Quantifizierung <i>P. larvae</i> -spezifischer Bakteriophagen.....	31
4.6.3	Quantifizierung des Einflusses <i>P. larvae</i> -spezifischer Bakteriophagen auf das Wachstum von <i>P. larvae</i> .....	31
4.6.4	Bestimmung der Wurfzahl <i>P. larvae</i> -spezifischer Bakteriophagen.....	31
4.6.5	Präparation von Bakteriophagen für die Elektronenmikroskopie.....	32
4.6.6	Elektronenmikroskopie der Bakteriophagen .....	32
4.6.7	Transformation des Bakteriophagen HB10c2 in <i>P. larvae</i> .....	33
4.7	Mikrobiologische Methoden.....	33
4.7.1	Quantifizierung mikrobiellen Wachstums .....	33
4.7.2	Bestimmung von Sporen- und Bakterienkonzentrationen .....	33
4.7.3	Minimale Hemmkonzentration (MHK) .....	34

4.8	Zellbiologische Methoden .....	34
4.8.1	Isolation primärer Darmepithelzellen aus <i>A. mellifera</i> -Puppen.....	34
4.8.2	Kultivierung primärer Darmepithelzellen aus <i>A. mellifera</i> .....	36
4.9	Molekularbiologische Methoden .....	36
4.9.1	DNA-Isolation aus Bakteriophagen .....	36
4.9.2	Restriktionskartierung der Phagen-DNA .....	36
4.9.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	37
4.9.4	Ligation von Fragmenten in Vektoren .....	38
4.9.5	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten.....	38
4.9.6	Herstellung von Deletionskonstrukten zur Erstellung von <i>P. larvae</i> - Mutanten.....	38
4.9.7	Transformation von chemisch kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen .....	39
4.9.8	Herstellung von Deletionskonstrukten für den Bakteriophagen HB10c2.....	39
4.9.9	Transformation von <i>B. megaterium</i> -Protoplasten.....	40
4.9.10	Transformation von <i>P. larvae</i> .....	40
4.10	Proteinbiochemische Methoden .....	41
4.10.1	Präparation von Bakteriophagenproteinen.....	41
4.10.2	Bestimmung von Proteinkonzentrationen.....	41
4.10.3	SDS-Gelelektrophorese und Proteinvisualisierung .....	41
4.10.4	Isolation von Sekundärmetaboliten aus <i>P. larvae</i> .....	43
4.10.5	Dünnschichtchromatographie von Rohextrakten aus <i>P. larvae</i> .....	43
4.10.6	Säulenchromatographie und Fraktionierung von Rohextrakten aus <i>P. larvae</i> .....	43
4.10.7	<i>In vitro</i> -Nachweis nicht-ribosomaler produzierter Peptide .....	44
4.10.8	<i>In vivo</i> -Nachweis nicht-ribosomal produzierter Peptide .....	44
4.11	Infektionsbiologische Methoden .....	44
4.11.1	Vorbereitung der Bienenvölker für den <i>in vivo</i> -Larvenassay .....	44
4.11.2	<i>In vivo</i> -Larvenassay .....	45
4.11.3	<i>In vivo</i> -Infektionen von <i>A. mellifera</i> .....	46
4.11.4	<i>In vivo</i> -Phagentherapie .....	46
5	<u>Ergebnisse .....</u>	<u>48</u>
5.1	Isolation und Charakterisierung von <i>P. larvae</i> .....	48
5.1.1	Abundanz verschiedener Genotypen von <i>P. larvae</i> .....	48
5.1.2	Charakterisierung der Genotypen von <i>P. larvae</i> .....	50
5.2	Trcs als potentiellcs Therapeutikum der AFB und EFB.....	58
5.2.1	<i>In vitro</i> -Studien zur therapeutischen Wirkung der Trcs gegen bakteriell bedingte Brutkrankheiten von <i>A. mellifera</i> .....	58
5.2.2	<i>In vivo</i> -Studien an Bienenbrut zur Wirksamkeit der Trcs gegen <i>A. mellifera</i> .....	60
5.2.3	<i>In vivo</i> -Studien zur Wirksamkeit der Trcs gegen <i>P. larvae</i> in Bienenbrut .....	63
5.3	Bakteriophagen als potentiellcs Therapeutikum der AFB.....	66
5.3.1	Isolation von <i>P. larvae</i> -spezifischen Bakteriophagen.....	66
5.3.2	Charakterisierung der isolierten Bakteriophagen.....	66
5.3.3	Eignung der Bakteriophagen als Therapeutikum.....	76
6	<u>Diskussion .....</u>	<u>80</u>
6.1	Die Genotypen des Bienenpathogens <i>P. larvae</i> .....	80
6.1.1	Verbreitung und relative Häufigkeit von <i>P. larvae</i> .....	80
6.1.2	Verbreitung der Genotypen von <i>P. larvae</i> .....	81
6.1.3	Charakterisierung der Genotypen ERIC I-V von <i>P. larvae</i> .....	81

6.1.4	Vergleich der Virulenz der Genotypen ERIC I-V von <i>P. larvae</i> .....	82
6.1.5	Virulenzfaktoren von <i>P. larvae</i> .....	83
6.1.6	Paenilarvin als potentieller Virulenzfaktor von <i>P. larvae</i> .....	84
6.2	Trcs und ihre Wirkung in <i>A. mellifera</i> .....	86
6.2.1	Wirkung der Trcs auf das Mikrobiom von <i>A. mellifera</i> .....	86
6.2.2	Wirkung der Trcs auf Larven von <i>A. mellifera</i> .....	86
6.2.3	Trcs als potentielles Therapeutikum der AFB.....	87
6.3	Phagentherapie im Kampf gegen die AFB.....	90
6.3.1	Singuläre Applikation des Bakteriophagen HB10c2.....	90
6.3.2	Untersuchungen zur Virulenz von reisolieren <i>P. larvae</i> -Sporen aus zuvor therapierter Bienenbrut.....	90
6.3.3	Genomsequenzierung des Bakteriophagen HB10c2.....	91
6.3.4	Isolation und Charakterisierung weiterer therapeutisch geeigneter Bakteriophagen.....	92
6.3.5	Phagentherapie durch tägliche Phagenapplikation während des Larvalstadiums.....	93
6.3.6	Phagentherapie als alternative Bekämpfungsmaßnahme gegen die AFB.....	94
6.3.7	Coevolution zwischen Biene, AFB-Erreger und Bakteriophage.....	95
<u>7</u>	<u>Ausblick.....</u>	<u>98</u>
<u>8</u>	<u>Verzeichnisse.....</u>	<u>99</u>
8.1	Literaturverzeichnis.....	99
8.2	Abkürzungsverzeichnis.....	104
8.3	Abbildungsverzeichnis.....	106
8.4	Tabellenverzeichnis.....	108
8.5	Formelverzeichnis.....	109

## 1 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Erreger der anzeigepflichtigen Bienenseuche Amerikanische Faulbrut (AFB), *Paenibacillus larvae* näher charakterisiert. Dieses Gram-positive Bakterium kann in vier Genotypen mit jeweils unterschiedlicher Virulenz eingeteilt werden. Eine Therapie der AFB im eigentlichen Sinne ist nicht möglich, lediglich die Reduktion von Sporen stellt eine Möglichkeit der effektiven Bekämpfung dar.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Honigproben von fünf Kontinente auf die Abundanz von *P. larvae* untersucht. Die isolierten Stämme wurden genotypisiert und kartografiert. Hierbei konnte ein neuartiger, hochvirulenter fünfter Genotyp (ERIC V, DSM 106052) isoliert und beschrieben werden.

Durch die *de novo* Genomsequenzierung der fünf Genotypen konnten Differenzierungen zwischen ERIC I-V erfolgen. Diese erfolgten mit Hinblick auf NRPS/PKS-Gencluster. Die hierdurch kodierten Sekundärmetabolite stellen potentielle Virulenzfaktoren dar. Die Paenilarvine, Lipopetide aus der Familie der Iturin-like Proteine, wurden hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität gegenüber Bienenbrut und Vertretern des Mikrobioms von *Apis mellifera* getestet. Eine signifikante Steigerung der Mortalität, verglichen mit der Kontrollpopulation, konnte weder für die Dosis von 2,5 µg/Larve, noch für 5 µg/Larve festgestellt werden. Dadurch konnte die Bestätigung der Paenilarvine als Virulenzfaktor nicht erfolgen. Weiterführende Arbeiten zeigten jedoch, dass Paenilarvine eine biologische Aktivität gegenüber einer Vielzahl an Mikroorganismen aufweisen. Diese Ergebnisse lassen eine Funktion als Fitnessfaktoren bei der Schaffung der ökologischen Nische vermuten.

Ergänzend wurden Versuche zur biologischen Aktivität von Thyrotricinen (Trcs) gegenüber Bienenbrut und dem Mikrobiom von *A. mellifera* durchgeführt. Hierdurch konnte die Schadschwelle der Konzentration für Honigbienenbrut bestimmt werden. Diese erwies sich als deutlich höher, als die ermittelten minimalen Hemmkonzentrationen gegenüber dem Entomopathogen *P. larvae*. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden die hinsichtlich ihrer Therapeutischen Eignung gegen die AFB *in vivo* getestet. Ein therapeutischer Effekt konnte nicht gezeigt werden. Stattdessen wiesen die Testindividuen eine signifikant erhöhte Mortalität auf.

Als Alternative zu klassischen Therapeutika wurden *P. larvae*-spezifische Bakteriophagen hinsichtlich ihrer potentiellen therapeutischen Eignung analysiert. Zehn Bakteriophagen-Isolate konnten im Rahmen dieser Arbeit charakterisiert werden. Der Bakteriophage HB10c2 wurde in einer Pilot-Studie hinsichtlich der therapeutischen Eignung untersucht. Ein signifikanter Therapieerfolg konnte hierbei durch die singuläre Applikation nicht erzielt werden, jedoch konnten Erkenntnisse für die sichere Anwendung und Voraussetzungen für eine Phagentherapie etabliert werden. Durch Modifizierungen der *in vivo* Therapieversuche konnte für die kontinuierliche Applikation des Bakteriophagen HBx eine signifikante Verringerung der Mortalität gezeigt werden.

Weiterhin konnten durch die *de novo* Sequenzierung des Bakteriophagen HB10c2 Markergene identifiziert werden, die im Rahmen dieser Arbeit zur Charakterisierung der Bakteriophagen-Isolate herangezogen wurden. Dabei stellte sich heraus, dass alle isolierten *P. larvae*-spezifischen Bakteriophagen über eine Integrase Verfügen und somit zu den lysogenen Bakteriophagen zählen. Dieses Ergebnis deutet auf eine koevolutionäre Adaption der Bakteriophagen an ihren Wirt *P. larvae* und dessen Lebensraum Bienenvolk vor dem Hintergrund der jahreszeitlichen Entwicklungsstadien hin.

## 2 Summary

This work focusses on *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American Foulbrood (AFB) in honeybees, which is subjected to registration in many countries. The Gram-positive entomopathogen can be subdivided into four genotypes that differ in their virulence. A therapeutic approach does not exist, only the reduction of spores is used to fight against AFB.

During this work, honey samples derived from five continents were analyzed for the abundance of *P. larvae*. Isolated strains were genotyped and characterized. Thereby, a new fifth, highly virulent genotype (ERIC V, DSM 106052) was discovered and described.

*De novo* sequencing of all five genotypes allowed differentiations between ERIC I-V. Therefore, genomes were analyzed for NRPS/PKS gene clusters. These encoded secondary metabolites are known as potential virulence factors. Paenilarvins, iturin-family lipopeptides, were analyzed for their biological activity against bee brood and representative bacterial strains of the gut microbiota of *Apis mellifera*. Increases for mortality were not indicated, compared to the respective control groups, for both tested concentrations, 2.5 µg/larva and 5.0 µg/larva. Therefore, paenilarvins could not be verified as virulence factors. Further studies on this topic indicated an activity of paenilarvins against a number of microorganisms. According to these results, paenilarvins may act as fitness factor to create an ecological niche for *P. larvae*.

Additionally experiments were performed to determine the biological activity of thyrotricins (Tres) against honeybee brood and microbiota of *A. mellifera*. The ecologically harmless concentration against bee larvae, which was much higher than the minimal inhibitory concentration against the entomopathogen *P. larvae*, was determined in *in vivo* exposure assays. Based on these results, Tres were used for analysis of their therapeutic potential against AFB in *in vivo* assays. Nevertheless, treated individual showed a significant increasing of mortality.

As an alternative compared to traditional therapies, *P. larvae*-directed bacteriophages were analyzed for their potential therapeutic use. A number of ten bacteriophage isolates were characterized during this work. Bacteriophage HB10c2 was tested for its application in a primary study. Significant decreases of mortality in treated individuals could not be shown by single application to infected larvae. But the essentials for a safe application of bacteriophages in honeybees could be derived from these results. By modifications of phage application with bacteriophage HB $\chi$  a significant decrease of mortality in the treated individuals could be shown, by continuous application of bacteriophages.

Furthermore, *de novo* sequencing of bacteriophage HB10c2 indicated some marker genes that were used for the characterization of bacteriophage isolates during this work. Thereby, all *P. larvae*-directed bacteriophage were identified to carry an integrase in their genomes, which indicate them as lysogenic bacteriophages. Taken together, these results indicate co-evolutionary adaption of the bacteriophages and their host *P. larvae* in their shared environment honeybee, respective to the developmental stages of the colony among the seasons.

### 3 Einleitung

#### 3.1 Die westliche Honigbiene – *Apis mellifera*

Die westliche Honigbiene *Apis mellifera* zählt zu den staatenbildenden Insekten in der Ordnung der Hautflügler (Hymenoptera). Völker von *A. mellifera* bestehen je nach Jahreszeit aus bis zu 60.000 Individuen zusammen (Kettner *et al.*, 1988). Das Bienenvolk bildet drei unterschiedliche Kasten (Königin, Arbeiterin, Drohne), deren Individuenzahl je nach Jahreszeit unterschiedlich ist (Kettner *et al.*, 1988). Neben den Imagines finden sich in den Völkern von *A. mellifera* auch Eier, Larven und (Vor-) Puppen in den Waben. Somit weist die Honigbiene eine vollständige Metamorphose im Rahmen ihrer Entwicklung auf und zählt damit zu den holometabolen Insekten.

Im Regelfall beherbergt das Bienenvolk eine Königin (auch Weisel), die das einzige vermehrungsfähige Weibchen des Volkes ist. Ihre Aufgabe besteht in der Eiablage. Im Alter von circa 7-10 Tagen fliegt die Königin zu Begattungsflügen aus und speichert das Sperma von bis zu 30 verschiedenen Drohnen in ihrer Spermatheka, sodass sie über ihren gesamten Lebenszeitraum die Eiablage aufrecht erhalten kann. Aus unbefruchteten Eiern gehen die Drohnen hervor, die einen haploiden Chromosomensatz (1n) aufweisen und die vermehrungsfähigen Männchen ausmachen. In den Sommermonaten beherbergt das Bienenvolk einige hundert Individuen dieser Kaste. Die Aufgabe der Drohnen besteht in der Begattung jungfräulicher Königinnen. Drohnen lassen sich im Normalfall nur in den Sommermonaten finden und sind ohne die Pflege der Arbeiterinnen nicht überlebensfähig. Den wesentlichen Teil des Bienenvolkes machen Arbeiterinnen aus, die aus befruchteten Eiern hervorgehen. Sie verfügen über einen diploiden Chromosomensatz (2n). Aus befruchteten Eiern können auch diploide Drohnen hervorgehen, die jedoch im frühen Larvenstadium von den Ammen erkannt und gefressen werden (Herrmann *et al.*, 2005). Die Arbeiterinnen übernehmen hingegen alle wichtigen Aufgaben, die zur Aufrechterhaltung des Bienenvolkes notwendig sind. Hierzu zählen beispielsweise die Versorgung (Nektar, Pollen, Wasser, Ventilation, Thermoregulation), die Schaffung und Erhalt von Infrastrukturen (Wabenbau, Kommunikation hinsichtlich Nahrungsquellen) und nicht zuletzt die Verteidigung. Eine wesentliche Aufgabe ist die Versorgung der Bienenbrut, einschließlich der Fütterung und Hygiene.

Die Honigbiene stellt neben Rind und Schwein das drittwichtigste Nutztier der Menschheit dar. Dieser Nutzen zeichnet sich vor allen durch die Bestäubungstätigkeit aus. *A. mellifera* überwintert als gesamtes Volk mit etwa 10.000-15.000 Bienen (Weiß, 2003) und steht damit bereits im Frühjahr mit großer Individuenzahl für die Bestäubung zur Verfügung. Hinzu kommt, dass die Biene im Gegensatz zu vielen andern Bestäubern eine Blütenstetigkeit aufweist und somit die flächendeckende Bestäubung besser gewährleisten kann als beispielsweise Hummeln (Kettner *et al.*, 1988).

##### 3.1.1 Lebenszyklus der Arbeiterin

Der Lebenszyklus der Arbeiterin lässt sich in drei grobe Lebensabschnitte einteilen.

Den ersten Lebensabschnitt stellt die Brutphase dar und umfasst 21 Tage. Die ersten drei Tage (d<sub>1</sub>-d<sub>3</sub>) bilden das Embryo-Stadium, in dem das Ei (imkerlich auch Stift genannt) zunächst in der geöffneten Brutzelle steht und sich dann auf den Boden der Zelle legt. Diesem Stadium folgt das Larvenstadium (imkerlich auch Rundmade genannt), welches sechs Tage (d<sub>4</sub>-d<sub>9</sub>) umfasst. Die ersten 30 Lebensstunden stellen den kritischen Zeitraum für eine Infektion mit *P. larvae* dar. Nach dieser Zeit hat sich die peritrophische Matrix ausgebildet. Diese kleidet den Mitteldarm von innen her aus und stellt eine natürliche Barriere dar, die es den Mikrobiota des Mitteldarms nicht ermöglicht mit den

Zellen des Darmepithels in Kontakt zu treten oder in die Hämolymphe zu transmigrieren. Im Larvenstadium durchläuft die Larve insgesamt vier Häutungen. Am Ende des Larvenstadiums ( $d_9$ ) richtet sich die Larve in ihrer Zelle auf (imkerlich auch Streckmade genannt), Mittel- und Enddarm verbinden sich und es kommt zur Defekation. Daraufhin werden die Brutzellen verdeckelt und die Larve verpuppt sich (fünfte Häutung) innerhalb der verdeckelten Zelle ( $d_{13}$ - $d_{20}$ ). Abschließend folgt mit der sechsten Häutung die Imaginalhäutung und die Imago schlüpft aus der Brutzelle ( $d_{21}$ ) (Weiß, 2003).

Die Imago übernimmt nach dem Schlupf als Stockbiene verschiedene Aufgaben ( $d_{21}$ -ca.  $d_{41}$ ), die mit dem Alter der Tiere wechseln. Dieser Wechsel korreliert mit dem Ausbildungszustand bestimmter Organe. Direkt nach dem Schlupf werden Reinigungsarbeiten ( $d_{21}$ - $d_{24}$ ) übernommen. In dieser Zeit entwickelt sich die Futtersaftdrüse, sodass nach der Pflege der älteren Larven ( $\geq d_{25}$ ) die Pflege der jüngsten Larven übernommen werden kann. Das anschließende Ausbilden der Wachdrüsen befähigt die Arbeiterinnen zum Bau und Ausbessern von Waben (ab  $d_{31}$ ). Ab diesem Alter werden innerhalb des Stockes verschiedenste Aufgaben übernommen ( $d_{31}$ - $d_{41}$ ). Hierzu zählt beispielsweise das Umtragen von Futter, Pollenstampfen und grobe Reinigungsarbeiten. Abschließend kann nach dem Füllen der Giftblase der Wachdienst übernommen werden ( $\sim d_{41}$ ) (Kettner *et al.*, 1988; Weiß, 2003).

Den letzten Abschnitt des Arbeiterinnenlebens stellt die Phase als Flugbiene dar. Die Flugbienen übernehmen die Versorgung der Stockbienen und der Brut durch das Herbeischaffen von Nektar, Pollen, Wasser und Kittharz. Die Kommunikation und Interaktion über lukrative Sammelplätze erhält der Großteil der Flugbienen von wenigen Kundschafterinnen, die entsprechende Nahrungsquellen zuvor ausfindig gemacht haben und deren Lage über die *Tanzsprache* den übrigen Sammlerinnen mitteilen (Kettner *et al.*, 1988; Weiß, 2003).

### 3.1.2 Abwehrmechanismen der Biene gegenüber Infektionskrankheiten

Einen wesentlichen Abwehrmechanismus des Bienenvolkes gegenüber Krankheiten macht die soziale Immunität aus (Cremer *et al.*, 2007). Hierzu zählt beispielsweise das Entfernen toter Individuen aus dem Stock, sowie das Entfernen auffälliger und toter Brut (Kettner *et al.*, 1988). So konnte in Infektionsversuchen gezeigt werden, dass Bienenvölker mit höherem Hygieneverhalten, bezogen auf das Ausräumen geschädigter Brutzellen, eine höhere Toleranz gegenüber Infektionen mit *P. larvae* aufwiesen. Dahingegen wies die Kontrollgruppe ohne erhöhtes Hygieneverhalten innerhalb desselben Zeitraumes nach der Infektion bereits klinische Symptome der AFB auf (Stow *et al.*, 2007).

Eine wichtige Komponente im Rahmen der individuellen Abwehr gegen Endopathogene stellt bei *A. mellifera* die peritrophische Matrix (PM) dar. Diese Schicht, bestehend aus Chitin und Proteinen, wird von den Darmepithelzellen gebildet und kleidet diesen als eine Art Barriere von innen her aus. Dabei stellt die PM eine Barriere dar, die die Mikrobiota des Mitteldarms in diesem zurückhält und den direkten Kontakt des Darminhaltes mit dem Darmepithel verhindert (Takamatsu *et al.*, 2016; Yue *et al.*, 2008). Speziell im Bereich der AFB kommt der PM eine besondere Rolle zu, da lediglich Larven, deren PM noch nicht vollständig ausgeprägt ist, mit *P. larvae* infiziert werden können (Yue *et al.*, 2008). Weiterhin konnte in *P. larvae* ein Virulenzfaktor nachgewiesen werden, der speziell auf den Abbau der PM ausgelegt ist (Garcia-Gonzalez and Genersch, 2013).

Neben den mechanischen Abwehrmechanismen sind antimikrobiell wirkende Peptide bekannt, die von *A. mellifera* produziert und unter anderem in die Hämolymphe sezerniert werden (Casteels *et al.*, 1989; Sokół, 1999).

Einen weiteren Aspekt der Abwehrmechanismen stellen Sekundärmetabolite dar, die vom Mikrobiom der Biene sezerniert werden (Mohr and Tebbe, 2006, 2007; Troskie *et al.*, 2014a). Speziell die Gattung



*Lactobacillus* scheint hierbei eine wichtige Rolle einzunehmen, um das natürliche Mikrobiom der Honigbienen gegenüber invasiven bakteriellen Spezies zu schützen (Forsgren *et al.*, 2010).

In den letzten Jahren konnte zusätzlich gezeigt werden, dass durch die Injektion inaktiverter *P. larvae* in Königinnen von *A. mellifera* die Brut eine erhöhte Resistenz gegenüber *P. larvae* aufwies (Hernández-Martínez *et al.*, 2010). Der Wirkmechanismus zur generationsübergreifenden Immunitätsvermittlung in Invertebraten (z.B. Insekten) konnte zunächst nicht aufgeklärt werden. Das Eidotter-Protein Vitellogenin konnte 2015 als erstes Protein in Insekten identifiziert werden, welches an die Oberflächenstrukturen von Bakterien (LPS) binden kann. Vitellogenin wird im Fettkörper der Imago gebildet und anschließend in die Hämolymphe sezerniert. Über Rezeptorvermittelte Endozytose kann das Vitellogenin dann von den Eiern (in den Ovarien der Imago) aufgenommen werden (Salmela *et al.*, 2015). Somit konnte Vitellogenin als Teil des Immunsystems der Invertebraten identifiziert werden. Weiterhin konnte in 2016 ein Lecithin (1-*O*-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin) identifiziert werden, das von älteren Larven (~3 d nach dem Schlupf) produziert wird und eine hohe biologische Aktivität gegenüber Bakterien aufweist. Insbesondere konnte gezeigt werden, dass dieses Lecithin eine Wirksamkeit gegenüber *P. larvae* und *M. plutonius* aufweist (Riessberger-Gallé *et al.*, 2016). Folglich verfügt *A. mellifera* neben dem sozialen Immunsystem auch über ein angeborenes Immunsystem.

### **3.2 Amerikanische Faulbrut – *Paenibacillus larvae***

Die Amerikanische Faulbrut (AFB) stellt neben der Europäischen Faulbrut (EFB) die einzige bakteriell bedingte Infektionskrankheit der Honigbiene dar. Dabei können lediglich die Larven mit den Sporen des Erregers infiziert werden und an AFB erkranken. Die Infektionsanfälligkeit der Larven ist in den ersten 30 h nach dem Schlupf am größten und korreliert mit der Ausprägung der peritrophischen Matrix (Yue *et al.*, 2008). Die Erstbeschreibung des Erregers als Verursacher der AFB nebst Beschreibung erfolgte 1906 durch White (White, 1906). Bei *P. larvae* handelt es sich um ein Gram-positives, stäbchenförmiges Bakterium, das in der Lage ist siebenwandige Endosporen auszubilden. Diese Sporen führen nach oraler Aufnahme durch die Larven bereits in sehr geringer Zahl zu deren Tod. Durch die verheerenden Folgen, die im Rahmen der Infektion der Brut in einem Bienenvolk entstehen und die Ausbreitungsgefahr durch Verflug und Räuberei zählt die AFB zu den anzeigepflichtigen Bienenseuchen (von der Ohe, 2001).

Adulte Bienen können im Gegensatz zu den Larven nicht infiziert werden, jedoch können sie Sporen in der Futterblase und im Haarkleid transportieren und so als Vektor des Erregers fungieren (Genersch, 2010; H Kettner *et al.*, 1988). Andere Insekten oder höhere Lebewesen sind ebenfalls nicht sensitiv für die Infektion mit *P. larvae*.

#### **3.2.1 Genotypen von *P. larvae***

*Paenibacillus larvae* wurde zuerst durch White im Jahr 1906 unter dem Namen *Bacillus larvae* isoliert und beschrieben (White, 1906). Hierbei wurde das Bakterium als der Erreger der Amerikanischen Faulbrut isoliert. Da die Isolation aus einer Larve der Honigbiene erfolgte und die isolierten Bakterien in der Morphologie der Gattung *Bacillus* ähnelten, erfolgte die Nomenklatur als *B. larvae*. Eine weitere Isolation erfolgte 1950 (Katznelson, H., 1950) ebenfalls aus symptomatischen Völkern. Da die AFB-Schleime jedoch eine Pigmentierung aufwiesen und die AFB-Schorfe eine Art *puderigen Überzug* aufwiesen, wurde der isolierte Erreger als *B. pulvifaciens* klassifiziert.

Mit dem Aufkommen der DNA-basierten molekular- und biochemischen Methoden wurde unter anderem die DNA der Gattung *Bacillus* analysiert. Dabei wurde festgestellt, dass die Erreger der AFB

in die neu geschaffene Gattung *Paenibacillus*, anstatt *Bacillus* einzuordnen sind (Ash, C. *et al.*, 1993, 1991). Der Name *Paenibacillus* (lat.: paeni=nahe bei) bezieht sich auf die Homologien zwischen den beiden Gattungen, die erst durch DNA-Analysen voneinander differenziert werden konnten.

Durch weitere Analysen der Arten *P. larvae* und *P. pulvifaciens* im Jahr 1996 (Heyndrickx *et al.*, 1996) wurden beide Erreger in der Art *P. larvae* zusammengefasst und über zwei Subspezies (*P. larvae* subsp. *larvae* und subsp. *pulvifaciens*) voneinander differenziert.

Eine umfassende Analyse der unterschiedlichen Isolate beider Subspezies im Jahr 2006 (Genersch *et al.*, 2006) mit verschiedenen Analysemethoden kam zu dem Ergebnis, dass sich die Isolate von *P. larvae* durch eine repetitive PCR (repPCR) unter der Verwendung von *enterobacterial repetitive intergenic consensus* (ERIC)-Primern in vier Gruppen (ERIC I-IV) anhand ihrer genetischen Fingerabdrücke unterteilen lassen.

Somit lässt sich *P. larvae* als Erreger der AFB zum gegenwärtigen Zeitpunkt in vier verschiedene Genotypen unterteilen, die sich hinsichtlich ihrer Abundanz und Virulenz voneinander unterscheiden (Genersch *et al.*, 2006). Der Fokus liegt jedoch auf den Genotypen ERIC I und ERIC II, da diese beiden nahezu alle Nachweise von *P. larvae* ausmachen (Genersch *et al.*, 2006; Genersch, 2010; Morrissey *et al.*, 2015).

### 3.2.2 Pathogenese und Virulenzfaktoren von *P. larvae*

Die Infektion der jungen Larven erfolgt in der Regel in den ersten 36 Stunden nach dem Schlupf durch kontaminiertes Futter. Hierbei ist bereits eine Dosis von ~10 Sporen für eine erfolgreiche Infektion der Larve ausreichend (Yue *et al.*, 2008). Im Mitteldarm keimen die Sporen zu vegetativen Zellen aus, die durch die Produktion antimikrobieller Substanzen ihre ökologische Nische gegenüber dem Mikrobiom behaupten (Ebeling *et al.*, 2016; Müller *et al.*, 2015; Yue *et al.*, 2008). Danach folgt eine massive Proliferation der Entomopathogene im Mitteldarm, in deren Folge diverse Proteasen sezerniert werden. Diese extrazellulären Proteasen schädigen zunächst die peritrophische Matrix, sodass das Darmepithel durch *P. larvae* angegriffen werden kann (Garcia-Gonzalez *et al.*, 2014b; Garcia-Gonzalez and Genersch, 2013; Yue *et al.*, 2008). Im Rahmen dieses Prozesses stirbt die Larve/Puppe. Anschließend migriert *P. larvae* über den Parazellularweg durch das Mitteldarmepithel ins Lumen und zersetzt den Kadaver in den faulbruttypischen Schleim, der zum überwiegenden Teil aus vegetativen Zellen und Sporen des Pathogens besteht (Yue *et al.*, 2008). Über den Putztrieb der Stockbienen werden die Sporen ihrerseits wieder im Bienenvolk verteilt und führen bei oraler Aufnahme zu weiteren Infektionen der Brut (Genersch, 2010).

Betrachtet man die Pathogenese der Genotypen ERIC I und ERIC II genauer, fällt auf, dass in Infektionen mit dem Genotyp ERIC I die LT<sub>100</sub> etwa 12 Tage nach der Infektion der Larven erreicht wird. Bei ERIC II wird die LT<sub>100</sub> hingegen bereits nach circa 7 Tagen erreicht (Genersch *et al.*, 2006; Genersch, 2010; Yue *et al.*, 2008). Somit unterscheiden sich beide Genotypen in ihrer Virulenz.

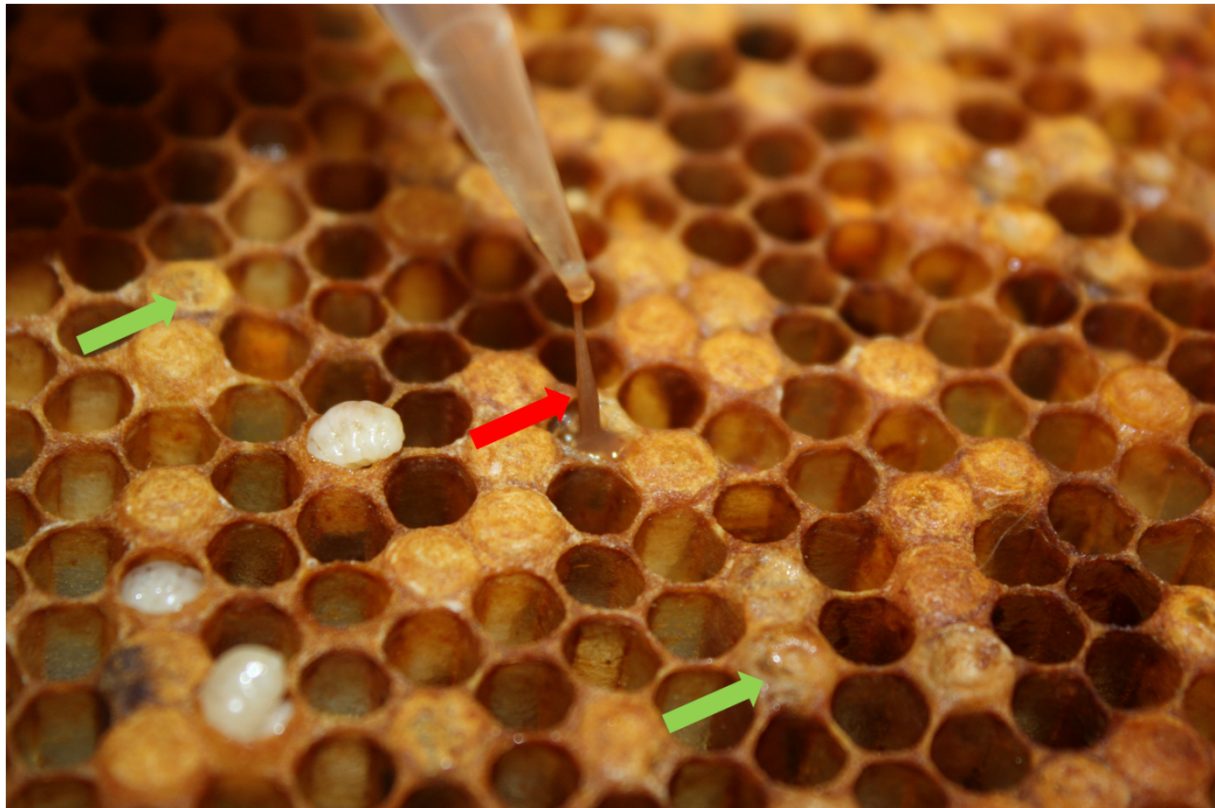
Die Genotypen ERIC I und ERIC II wurden ausführlich hinsichtlich ihres genetischen Potentials analysiert (Djukic *et al.*, 2014a). Im Rahmen dieser Analyse konnten verschiedene potentielle Virulenzfaktoren identifiziert werden. Charakteristisch für den Genotypen ERIC I sind hierbei die AB-Toxine Plx1 und Plx2, welche eine Funktion in der Schädigung des Darmepithels haben (Fünfhaus *et al.*, 2013). Weiterhin konnten durch die Genomanalyse von ERIC I und ERIC II vier NRPS-Cluster nachgewiesen werden (Djukic *et al.*, 2014a; Ebeling *et al.*, 2016; Müller *et al.*, 2015). Die kodierten nicht-ribosomal produzierten Peptide sind aus vielen Mikroorganismen als potentiell biologisch aktive Substanzen bekannt (Kries, 2016). Für die nicht-ribosomal produzierten Peptiden Sevadacin, Bacillibactin und Paenilamicin konnte keine direkte Eigenschaft als Virulenzfaktor nachgewiesen werden (Ebeling *et al.*, 2016; Garcia-Gonzalez *et al.*, 2014a; Hertlein *et al.*, 2014; Müller *et al.*, 2014),

jedoch scheinen sie in der Bereitung der ökologischen Nische eine wichtige Rolle zu spielen. Interessant stellt sich hierbei die Tatsache dar, dass die kompletten funktionsfähigen NRPS-Cluster nur im Genotyp ERIC II, jedoch nicht in ERIC I vorhanden sind (Djukic *et al.*, 2014a; Ebeling *et al.*, 2016; Sood *et al.*, 2014). Sie könnten einen Teil der erhöhten Virulenz von ERIC II ausmachen. Im Gegensatz zu den nicht-ribosomal produzierten Peptiden konnte das S-Layer-Protein SPIA als Virulenzfaktor des Genotyp ERIC II charakterisiert werden (Poppinga *et al.*, 2012).

### 3.2.3 Nachweis von AFB-Infektionen

Die Infektionen von Bienenvölkern mit dem AFB-Erreger und potentielle AFB-Ausbrüche werden im Regelfall über den Nachweis der Sporen von *P. larvae* im Futterkranz, bzw. Honig (von der Ohe, 2001) festgestellt. Hierzu werden die Proben aufgearbeitet und die Sporen auf geeigneten Medien zur Germination gebracht, anschließend erfolgt die Identifizierung des Erregers auf mikrobiologischer Basis (Genersch, 2010; LAVES IB Celle, n.d.). Anhand des klassischen mikrobiologischen Nachweises des Erregers lassen sich die Befunde in drei AFB-Sporenkategorien einteilen: Kategorie 0 = kein Sporennachweis, Kategorie I=niedriger Sporengehalt (Futterkranzprobe 1-22 Kolonien; Honigproben 1-12 Kolonien) und Kategorie II=hoher Sporengehalt (Futterkranzprobe  $\geq 23$  Kolonien, Honigproben  $\geq 13$  Kolonien) (LAVES IB Celle, n.d.). Über diese Art der Sporenkategorie lassen sich Rückschlüsse über den Zustand der betroffenen Völker ziehen. Die Sporenkategorie II gibt einen deutlich Hinweis darauf, dass die AFB in den betroffenen Völkern bereits ausgebrochen ist und die typischen Symptome deutlich erkennbar sind. Bei der Kategorie I sind die entsprechenden Völker zwar bereits infiziert, jedoch ist die AFB noch nicht ausgebrochen. Durch die Kategorie I lassen sich AFB-Infektionen also frühzeitig (1-3 Jahre vor dem Ausbruch) erkennen und bekämpfen, wodurch weitere Infektionen, die von diesen Völkern ausgehen, unterbunden werden können (LAVES IB Celle, n.d.; von der Ohe, 2001, 2016a). Bei der klassisch mikrobiologischen Methode ist jedoch der Faktor Zeit nachteilig, da die Sporen nach der Probenaufarbeitung zunächst für sechs Tage inkubiert werden müssen, bevor eine Auswertung und ggf. weitere Analyseschritte folgen können.

Eine weitere Form des Nachweises stellt der molekularbiologische Nachweis mittels PCR dar (Govan *et al.*, 1999). Hier lassen sich *P. larvae*-typische Kolonien innerhalb weniger Stunden als positiv oder negativ einstufen. Diese Methode ist jedoch ebenfalls auf die vegetative Form des Erregers angewiesen, da sich die benötigte Template-DNA aus den Sporen nicht in ausreichender Menge isolieren lässt. Weiterhin ist eine Klassifizierung in die o.g. AFB-Sporenkategorien mit dieser Methode nicht möglich. Jedoch lässt sich der Faktor Zeit durch spezielle Aufarbeitungsverfahren massiv reduzieren (Beims, 2012a). Durch Adaption des Verfahrens zum molekularbiologischen Nachweis des Erregers mit zeitgleicher Quantifizierung der Erregermenge würde sich das qPCR-Verfahren anbieten. Hierzu existieren bereits Versuche (Han *et al.*, 2008, p.), die jedoch eine vorherige Germination und Kultivierung des Erregers aus der Honig- oder Futterkranzprobe voraussetzen.



**Abbildung 1: Klinische Symptome einer AFB Infektion.** Dargestellt ist ausschnittsweise das löchrige Brutnest mit eingefallenen Zelldeckeln (grüne Pfeile) und die fadenziehende Masse im Rahmen der sog. Streichholzprobe (roter Pfeil).

Eine weitere Möglichkeit des Nachweises stellt die Feststellung der klinischen Symptome durch den Amtstierarzt dar. Hierzu wird das Brutnest der betroffenen Völker gesichtet und die sog. Streichholzprobe durchgeführt (Kettner *et al.*, 1988). Dazu wird mit einem Gegenstand durch den eingefallenen Zelldeckel gestochen. Sofern beim Herausziehen des Gegenstandes der AFB-typische Schleim als eine Art Faden (fadenziehende Masse) erkennbar ist, handelt es sich mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit um AFB (Abbildung 1). Der Erregernachweis kann in solchen Fällen direkt mittels PCR (Govan *et al.*, 1999), klassischer Mikrobiologie (Genersch, 2010; LAVES IB Celle, n.d.) oder kommerziell erhältlichen, antikörperbasierten Kits (AFB-Schnelldiagnose, S+B medVET, Babenhausen) durchgeführt werden. Bei klinischen Befunden können auch die eingetrockneten Überreste der AFB-Schleime, auch Faulbrutschorfe genannt, als Kriterium zum Nachweis herangezogen werden.

### 3.2.4 Vorgehensweisen bei AFB-Infektionen

Bei Ausbruch oder Nachweis der AFB stehen drei generelle Verfahren zur Verfügung. Hierbei handelt es sich um die Verabreichung von Antibiotika an erkrankte Völker, die Verbrennung des Materials nebst Abtöten der Völker und das Sanieren infizierter Bestände. Weiterhin sieht die Bienenseuchenverordnung vor, dass beim Ausbruch der AFB Sperrbezirke um den betroffenen Bienenstand errichtet werden (*BienSeuchV*, 2014).

*P. larvae* weist eine Sensitivität gegenüber Tetracyclinen und Sulfonamiden auf (Genersch, 2010; H Kettner *et al.*, 1988). Bis 2005 war jedoch nur Oxytetracyclin als Präparat in den USA für die Bienenhaltung zugelassen, bis mit Tylosin (Wirkstoffklasse der Makrolide) 2007 ein weiteres Präparat die Marktzulassung erhielt (Genersch, 2010; Tian *et al.*, 2012). Die Verwendung von Antibiotika in AFB-affected Völkern ist in der Europäischen Union gesetzlich verboten, in den USA jedoch

nicht. Dieses Verbot wird zum einen mit potentiellen Rückständen in den Produkten des Bienenvolkes (z.B. Honig und Wachs) begründet. Zum Anderen führt die Applikation der Antibiotika lediglich dazu, dass die Symptome der AFB im betroffenen Volk nicht mehr auftreten und eine Erkrankung der Larven ausbleibt. Die vegetativen Zellen von *P. larvae* werden durch die Antibiotika nach der Germination abgetötet, wohin gegen die Sporen selbst nicht beeinflusst werden. Die Sporen können somit weiter im Volk verbleiben und über Transmission in andere Völker gelangen. Dort können sie wiederum die AFB auslösen. Außerdem würde ein Absetzen der Medikation zum Wiederausbruch der AFB führen (Genersch, 2010). Als weiteren Nebeneffekt lassen sich Nachteile in der Überlebensrate der Bienenbrut feststellen (Genersch, 2010), die auf der Wirkung der Antibiotika auf das natürliche Mikrobiom der Bienenbrut basiert (Mohr and Tebbe, 2006, 2007; Tian *et al.*, 2012). Hinzu besteht die Möglichkeit des horizontalen Gentransfers und der Selektion potentieller antibiotikaresistenter Bakterien.

Als weitere Methode zur Bekämpfung der AFB findet das Verbrennen des kontaminierten Materials mitsamt der abgetöteten Bienenmasse eine Anwendung. Hierbei werden die Bienen zunächst durch Schwefelgase abgetötet und anschließend das kontaminierte Beutenmaterial mitsamt Waben, Brut und der toten Bienenmasse verbrannt (Genersch, 2010). Hierdurch wird einerseits das kontaminierte Material auf sichere Weise entsorgt, andererseits stehen dieser Methode jedoch erhebliche materielle Verluste gegenüber.

In Deutschland nimmt die Sanierung den überwiegenden Anteil der Verfahrensweisen ein. Diese Sanierung basiert auf der Grundlage, dass lediglich die jungen Larven von *P. larvae* infiziert werden können. Die Imagines sind hingegen auf Grund ihrer peritrophischen Matrix nicht durch die AFB gefährdet (Yue *et al.*, 2008), da diese das Darmepithel vor dem direkten Kontakt mit *P. larvae* und dessen Sekundärmetaboliten schützt. Im Rahmen einer Sanierung werden die adulten Bienen in Form von Kunstschwärmen aus den AFB-positiven Völkern entnommen und durch das sog. *offene* oder *geschlossene Kunstschwarmverfahren* saniert (Genersch, 2010; von der Ohe, W., 2003; von der Ohe, 2016a). Dieses Verfahren beinhaltet, dass die Sporen durch die adulten Bienen zwar mitgeführt, aber durch eine Hungerphase (geschlossenes Kunstschwarmverfahren), bzw. das mehrfache Entfernen des frischen Wabenbaus, sowie der darin eingelagerten Futterreserven (offenes Kunstschwarmverfahren) aus den Kunstschwärmen unter die Nachweisgrenze abgesenkt werden können. Somit geht eine Heilung des Volkes einher. Das kontaminierte Wabenmaterial (inkl. Futter) wird entsorgt. Arbeitsgeräte und Beutenmaterial können durch Abkochen in 5% (v/v) NaOH(aq) dekontaminiert werden (Hardt, 2016). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Dekontamination von *P. larvae*-belasteten Oberflächen auch durch radioaktive Strahlung möglich ist (De Guzman *et al.*, 2011).

### **3.3 Europäische Faulbrut – *Melissococcus plutonius***

Die Europäische Faulbrut (EFB), auch gutartige Faulbrut oder Sauerbrut genannt, wird durch das Gram-positive, kokkenförmige Bakterium *Melissococcus plutonius* ausgelöst (Bailey, 1957; Bailey and Gibbs, 1962). *M. plutonius* weist eine enge phylogenetische Zugehörigkeit zum Genus *Enterococcus* auf (Cai and Collins, 1994) und kann als aktive, vegetative Zelle oder als Überdauerungsform (rundliche Kapsel) vorliegen. Zum Keimen der Kapseln sind CO<sub>2</sub> und mikroaerophile bis anaerobe Bedingungen von Nöten. Über die Aufnahme infizierter Futtermasse, im speziellen über kontaminierten Pollen, infizieren sich die Larven. Im Mitteldarm keimen die Kapseln zu lanzettförmigen vegetativen Zellen aus (Forsgren, 2010). Die infektiöse Dosis liegt bei <100 Kapseln, wobei alle Larvenstadien für die Infektionen mit *M. plutonius* empfänglich sind. Die Infektionsempfänglichkeit der Larven sinkt jedoch mit steigendem Alter (Bailey and Ball, 1991). Die Wege der Infektion sind bisher wenig verstanden, jedoch gibt es Hinweise darauf, dass *M. plutonius* zunächst mit der Larve um das aufgenommene Futter konkurriert. Dabei kommt es zu einer

asymptomatischen Besiedlung des Mitteldarms, die in einer erhöhten Nahrungsaufnahme der Larve resultiert (Genersch, 2008). Larven, die hierdurch auffallen, werden zum Teil durch die Ammen ausgeräumt, sodass das Brutnest löchrig erscheint. Soweit das Ausräumen durch die Ammenbienen entfällt, tritt der Tod der Larve in einem Alter zwischen vier und fünf Tagen ein. Die betroffenen Larven fallen durch ihre untypische, gestreckte Lage in den geöffneten Brutzellen sowie eine gelbbraune bis hin zur grauen Färbung auf (Forsgren, 2010). Im Rahmen der Pathogenese vermehrt sich *M. plutonius* in großer Zahl im Mitteldarm und bildet zahlreiche kapselförmige Überdauerungsformen, die in der toten Larve, bzw. dem zuvor abgesetzten Kot zurückbleiben und als Ausgangspunkt für weitere Infektionen dienen (Genersch, 2008). Die Transmission des Erregers innerhalb des Bienenvolkes und zwischen verschiedenen Völkern geschieht durch die Arbeiterinnen. So tragen mehr als ein Drittel der Bienen eines gesunden Volkes den Erreger EFB als Teil ihres Mikrobioms, wobei die Reproduktion des Erregers nur innerhalb des Mitteldarms der Larve stattfinden kann (Forsgren, 2010; Genersch, 2008). Infektionen von *A. mellifera* mit *M. plutonius* verlaufen nicht immer letal. Durch imkerliche Maßnahmen zur Steigerung des Putztriebes und der Volksstärke, beispielsweise durch Reizfütterung, können betroffene Völker die EFB von selbst zu überwinden (Pohl, 2005). Aus diesem Grund zählt die EFB nicht zu den anzeigepflichtigen Bienenkrankheiten (*BienSeuchV*, 2014). In Deutschland hat die EFB zum gegenwärtigen Zeitpunkt keine ökologische Bedeutung (Genersch, 2008). Der Erregernachweis basiert neben der Kultivierung (Bailey, 1957; Bailey and Gibbs, 1962) auf molekularbiologischen Nachweismethoden aus klinischem Material (Govan *et al.*, 1998).

### 3.3.1 Kommensale Erreger der EFB

Neben der asymptomatischen Besiedelung des larvalen Mitteldarms durch *M. plutonius* lassen sich auch weitere Veränderungen in der Zusammensetzung des Mikrobioms im Mitteldarm der Larve beobachten (Forsgren, 2010). Zu den wesentlichen Kommensalen zählen *Enterococcus faecalis* und *Paenibacillus alvei*. So wurden diese beiden Erreger zunächst für die Verursacher der EFB gehalten, da sich diese wesentlich leichter als *M. plutonius* aus klinischem Material isolieren lassen. Neben den beiden oben genannten Kommensalen konnte *Brevibacillus laterosporus* in infizierten Larven nachgewiesen werden (Bailey and Ball, 1991). Diese Bakterien stellen als vegetative Zelle keinen Teil des Mikrobioms gesunder Bienen dar, jedoch können sie als Sporenbildner in erkrankten und toten Larven den Mitteldarm kolonisieren und saprolytisch aktiv werden (Forsgren, 2010). Die Zersetzung der Larven zur faulbruttypischen Masse wird demnach durch die Kommensalen herbeigeführt; im Falle eines sauren Geruches ist die Zersetzung maßgeblich auf *E. faecalis* zurückzuführen. Bei fauligem Geruch ist im Wesentlichen *P. alvei* an der saprolytischen Zersetzung der toten Larve beteiligt (Genersch, 2008).

### 3.3.2 Vorgehensweise bei EFB-Ausbrüchen

Bei der EFB handelt es sich um eine bakteriell bedingte Infektionskrankheit der Honigbiene (Bailey, 1957). Ähnlich der AFB ist eine Therapie der EFB, beispielsweise mit Antibiotika, in Deutschland nicht zugelassen, daher bestehen die wesentlichen imkerlichen Maßnahmen in der Prophylaxe, wie beispielsweise der Vermeidung des Einbringens fremden Wabenmaterials oder Futter.

Im Falle einer Infektion mit EFB sind je nach Schwere der Infektion verschiedene Maßnahmen zu ergreifen. So gilt es zunächst den Infektionsdruck im Volk zu mindern, beispielsweise durch die Entnahme befallener Brutwaben oder die Heilfütterung zur Verdünnung der Kapselmenge im Futter (Genersch, 2008). Weiterhin wird durch diese Maßnahme der Putztrieb gefördert. Ebenfalls können betroffene, in der Entwicklung stagnierende Völker durch Zufügen von Bienen aus gesunden Völkern gestärkt und damit der Putztrieb in betroffenen Völkern gefördert werden. Die Sanierung stark

erkrankter Völker kann zudem durch die Sanierung über das Kunstschwarmverfahren durchgeführt werden, da lediglich die Brut von *M. plutonius* infiziert wird (Forsgren, 2010; Genersch, 2008).

### 3.4 Zielsetzung der Arbeit

Die Zielsetzung dieser Arbeit bestand darin, die Interaktionen zwischen der Honigbiene (*A. mellifera*), dem Erreger der Amerikanischen Faulbrut (*P. larvae*) und *P. larvae*-spezifischen Bakteriophagen zu untersuchen. Weiterhin wurden alternative Therapieverfahren zur Bekämpfung der AFB unter Laborbedingungen erprobt.

Der Erreger der AFB kann mittels repPCR in verschiedene Genotypen unterteilt werden, die sich in ihrer Virulenz auf Individuenebene und Volksebene unterscheiden. *P. larvae* zeichnet sich durch Sekundärmetabolite und Proteasen aus, die es dem Erreger ermöglichen seine ökologische Nische optimal zu nutzen. Ein Ansatz dieser Arbeit bestand darin die Sekundärmetabolite des AFB-Erregers genauer zu analysieren und ihre potentielle Rolle als Virulenzfaktor zu untersuchen. Hierzu sollten Honigproben von fünf verschiedenen Kontinenten gesammelt, auf die Abundanz von *P. larvae* untersucht und anschließend genotypisiert werden. Besonderes Interesse galt dabei der Isolation neuartiger Genotypen (ERICs) und deren detaillierter Charakterisierung. Dazu zählten unter anderem die Analyse von *in vivo*-Larvenversuchen unter Laborbedingungen und die Analyse der Produktion von Sekundärmetaboliten unter *in vitro* und *in vivo* Bedingungen, sowie in tatsächlichen AFB-Ausbrüchen.

Sekundärmetabolite werden von Pflanzen, Pilzen und Bakterien gebildet und können unterschiedlichste Funktionen übernehmen, zu denen auch die Behauptung in der ökologischen Nische zählt. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Auswirkungen von Dekapeptiden aus *Brevibacillus parabrevis* auf ausgewählte Vertreter des Mikrobioms der Honigbiene, sowie auf die beiden bakteriellen Erreger von Brutkrankheiten (AFB und EFB) untersucht werden. Da in vorangegangenen Studien eine bakteriozide Wirkung festgestellt werden konnte, die deutlich über der toxischen Dosis adulter Bienen lag, sollte die Eignung dieser Dekapeptide als Therapeutikum im Kampf gegen die AFB in *in vivo*-Larveninfektionen getestet werden.

Die Phagentherapie stellt eine weitere potentielle Therapie der AFB dar. Erste Versuche mit dem Bakteriophagen HB10c2 hatten bereits *in vivo* eine Wirkung auf den Verlauf der AFB gezeigt. Im Rahmen dieser Arbeit sollten weitere Bakteriophagenisolate ausführlich charakterisiert werden. Dazu sollten potentielle Risikokriterien wie Lysogenie und Wirtsspektrum der Bakteriophagenisolate untersucht werden. Weiterhin sollten die phylogenetischen Beziehungen zwischen den Isolaten auf genetischer Grundlage analysiert werden. Abschließend sollten geeignete Bakteriophagen in *in vivo*-Larvenversuchen auf ihre therapeutische Wirkung gegen die AFB getestet werden.

Die Ergebnisse dieser drei Teilaspekte der vorliegenden Arbeit sollten dazu beitragen das Verständnis über die AFB und die unterschiedlichen Strategien der Erreger-Genotypen (ERICs) zu verbessern. Die Möglichkeit der Anwendung einer Phagentherapie im Kampf gegen die AFB sollte anhand verschiedener Bakteriophagenisolate untersucht werden. Weiterhin sollte aus den Ergebnissen eine These über das Zusammenspiel zwischen *A. mellifera*, *P. larvae* und *P. larvae*-spezifischen Bakteriophagen formuliert werden.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Geräte

Zur Durchführung der Versuche wurden die folgenden Geräte verwendet (Tabelle 1):

**Tabelle 1: Verwendete Geräte.**

Gerät	Hersteller	Typ
Anaerobentopf	Oxoid	C-27-80
Automatische Pipette	Brand	HandyStep®
Automatische Pipettierhilfe	Accumax	PipetHelp
CO <sub>2</sub> -Inkubator	Sanyo	MCO-18 AIC (UV)
Dessicator	Nalgene®	5317-0120
Eismaschine	Icematic	D101
Elektroporator	Bio-Rad	GenePulser Xcell™
Feinwaage	Sartorius	TE214S
Geldokumentationsanlage	DC Science Tec	DeVisionG
Gelelektrophoresekammer	G&P Kunststofftechnik	Mini
Inkubator	Wise Laboratory Instruments	WiseCube®
Intervallschüttler	IKA®	KS 130 basic
Inverses Mikroskop	Olympus	CKX31
Kühlzentrifuge	Sigma Laboratory Centrifuges	2K15C
Kulturenschüttler	Infors AG	TR-150
Magnetrührer	IKA®	Reo basic C RH basic 2
Mehrkanalpipetten	Rainin	Pipet-Lite Pipet-Lite XLS
Mikroliterpipetten	Rainin	Pipet-Lite Pipet-Lite XLS
PAGE-Kammer	Eppendorf Bio-Rad	Research Mini-PROTEIN® Tetra System
pH-Meter	Schott® Instruments	Lab 850
Pipettierhilfe	Brand	Macro
Power Supply	Peqlab Biotech. GmbH Bio-Rad	EV222 PowerPac™ Basic
Reinstwasseranlage	Millipore	MilliQSynthesis A10
Rollenschüttler	CAT	RM5
Rotationsverdampfer	Heidolph	VV2000
Sicherheitswerkbank	Thermo Scientific	Hera Safe
Spektralphotometer	Biochrom	Libra S22
Spektralphotometer	Peqlab Biotech. GmbH	NanoDrop® ND-1000
Stereomikroskop	Müller Optronic	-/-
Steuergerät für Vakuumpumpe	Buchi	B-168
Thermoblock	HLC Biotech	HLC
Thermocycler	Peqlab Biotech. GmbH Biometra® Bio-Rad	Peqstar96 Universal Gradient Tpersonal T100™ Thermal Cycler



Thermoshaker	Grant-Bio	PHMP-4
Elektronenmikroskop	Zeiss	EM 910
Ultrazentrifuge	Beckman Coulter	Optima™ L-90K
Vakuumpumpe	Buchi	V-7000
Vortexer	Scientific Industries	VortexGenie2
Waage	Sartorius	TE3102S
Wasserbad	GFL	1002
	Heidolph	WB2000
Zellmühle	MP™	FastPrep®-24
Zentrifuge	Beckman Coulter	Avanti® J-E
		Allegra™ X-12R
	Eppendorf	miniSpin
	Peqlab Biotech. GmbH	Multi-Spin MSC-3000
	Sigma	2K15C

## 4.2 Verbrauchsmaterialien

Allgemeine Verbrauchsmaterialien, wie beispielsweise Reaktionsgefäße, Schraubdeckelröhrchen, Kryoröhrchen, Pipettenspitzen, serologische Pipetten, Küvetten, Spritzen, Sterilfilter und Ähnliches wurden über verschiedene Firmen bezogen. Hierzu zählen BD Falcon, Brand, Eppendorf, Greiner bio-one, Nicot und Sarstedt.

Chemikalien und Medienzusätze wurden von den Firmen Invitrogen, Merck, Oxoid, Roth und Sigma-Aldrich bezogen. Spezielle Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 2 aufgeführt.

**Tabelle 2: Spezielle Verbrauchsmaterialien.**

Bezeichnung	Hersteller	Artikelnummer
13 mL	Beckman Coulter ®	344060
Ultrazentrifugenröhrchen		
70 mL	Beckman Coulter ®	355655
Ultrazentrifugenröhrchen		
InstaGene™ Matrix	Bio Rad	7326030
NukleoSpin® Tissue XS	Macherey-Nagel	740901.50
Phase Lock Gel Heavy 1.5 mL	5 Prime	2302810
Phase Lock Gel Light 15 mL	5 Prime	2302840
QIAquick® PCR Purification Kit	QIAGEN	28106
QIAprep® Spin Miniprep Kit	QIAGEN	27106
QIAquick® Gel Extraction Kit	QIAGEN	28706
Weiselnäpfchen	Nicot	

## 4.3 Bakterienstämme, Bakteriophagen, Bienenvölker

In Tabelle 3 sind die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme aufgeführt. Hierzu zählen neben gängigen Referenzstämmen auch Umweltisolate und Referenzstämmen, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet worden.

**Tabelle 3: Verwendete Bakterienstämme.**

Bakterienstamm	Beschreibung	Referenz
<i>Bacillus borstelensis</i>	WT	LMG, LMG 6347
<i>Bacillus licheniformis</i>	WT	LMG, LMG 7559
<i>Bacillus megaterium</i>	WT	LMG, LMG 7127
<i>Bacillus pumilus</i>	WT	LMG, LMG 3455

<i>Bacillus subtilis</i>	WT	LMG, LMG 2099
<i>Brevibacillus brevis</i>	WT	DSMZ, DSM 30
<i>Brevibacillus laterosporus</i>	WT	DSMZ, DSM 25
<i>Comamonas denitrificans</i>	WT	LMG, LMG 21602
<i>Delftia acidovorans</i>	WT	LMG, LMG 1226
<i>Enterococcus faecalis</i>	WT	DSMZ, DSM 20376
<i>Glucanobacter oxydans</i>	WT	DSMZ, DSM 2003
<i>Janthinobacterium lividum</i>	WT	LMG, LMG 2892
<i>Kocuria rosea</i>	WT	DSMZ, DSM 20447
<i>Lactobacillus crispatus</i>	WT	LMG, LMG 9479
<i>Melissococcus plutonius</i>	WT	LMG, LMG 20360
<i>Paenibacillus alvei</i>	WT	DSMZ, DSM 29
<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	WT	DSMZ, DSM 11730
<i>Paenibacillus apiarius</i>	WT	DSMZ, DSM 5581
<i>Paenibacillus castaneae</i>	WT	DSMZ, DSM 19417
<i>Paenibacillus cookii</i>	WT	DSMZ, DSM 16944
<i>Paenibacillus elgii</i>	WT	DSMZ, DSM 22254
<i>Paenibacillus filicis</i>	WT	DSMZ, DSM 23916
<i>Paenibacillus fonticola</i>	WT	DSMZ, DSM 21315
<i>Paenibacillus humicus</i>	WT	DSMZ, DSM 18784
<i>Paenibacillus lactis</i>	WT	DSMZ, DSM 15596
<i>Paenibacillus lautus</i>	WT	DSMZ, DSM 3035
<i>Paenibacillus nanensis</i>	WT	DSMZ, DSM 22867
<i>Paenibacillus pabuli</i>	WT	DSMZ, DSM 3036
<i>Paenibacillus peoriae</i>	WT	DSMZ, DSM 8320
<i>Paenibacillus phyllosphaerae</i>	WT	DSMZ, DSM 17399
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	WT	DSMZ, DSM 36
<i>Paenibacillus popilliae</i>	WT	DSMZ, DSM 22700
<i>Paenibacillus soli</i>	WT	DSMZ, DSM 21316
<i>Paenibacillus xylanilyticus</i>	WT	DSMZ, DSM 17225
<i>Paenibacillus larvae</i> ERIC I	WT, Genotyp ERIC I	DSMZ, DSM 7030
<i>Paenibacillus larvae</i> ERIC II	WT, Genotyp ERIC II	DSMZ, DSM 16116
<i>Paenibacillus larvae</i> ERIC II	WT, Genotyp ERIC II	DSMZ, DSM 25430
<i>Paenibacillus larvae</i> ERIC II	WT, Genotyp ERIC II	S. Sood, HZI, DSM 25430 (Djukic <i>et al.</i> , 2014)
<i>Paenibacillus larvae</i> ERIC III	WT, Genotyp ERIC III	LMG, LMG 16252
<i>Paenibacillus larvae</i> ERIC IV	WT, Genotyp ERIC IV	LMG, LMG 16247
<i>Paenibacillus larvae</i> ERIC V	WT, Genotyp ERIC V	DSMZ, DSM 106052 (Beims <i>et al. in prep.</i> )
<i>Paenibacillus larvae</i> Isolate	Umweltisolate	H. Beims, TU Braunschweig, Inst. f. Mikrobiologie (Beims <i>et al.</i> , 2015), Beims <i>et al. in prep.</i> )
<i>Pedobacter africanus</i>	WT	LMG, LMG 10345
<i>Planomicrobium okeanokoites</i>	WT	DSMZ, DSM 15489
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	WT	DSMZ, DSM 6147
<i>Ralstonia pickettii</i>	WT	LMG, LMG 5942
<i>Saccharibacter floricola</i>	WT	LMG, LMG 23170
<i>Salmonella enterica</i>	WT	DSMZ, DSM 11320
<i>Staphylococcus pasteurii</i>	WT	DSMZ, DSM 30868
<i>Staphylococcus salivarius</i>	WT	DSMZ, DSM 20067
<i>Streptomyces griseus</i>	WT	DSMZ, DSM 1471

Die verwendeten *P. larvae*-spezifischen Bakteriophagen sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

**Tabelle 4: Verwendete Bakteriophagen.**

Bakteriophage	Beschreibung	Referenz
HB1	<i>P. larvae</i> -spezifischer Bakteriophage	H. Beims, TU Braunschweig, Inst. f. Mikrobiologie
HB2	<i>P. larvae</i> -spezifischer Bakteriophage	H. Beims, TU Braunschweig, Inst. f. Mikrobiologie
HB4	<i>P. larvae</i> -spezifischer Bakteriophage	H. Beims, TU Braunschweig, Inst. f. Mikrobiologie
HB10c2	<i>P. larvae</i> -spezifischer Bakteriophage	H. Beims, TU Braunschweig, Inst. f. Mikrobiologie, DSM 27274(Beims <i>et al.</i> , 2015)
HB12	<i>P. larvae</i> -spezifischer Bakteriophage	H. Beims, TU Braunschweig, Inst. f. Mikrobiologie
HB13	<i>P. larvae</i> -spezifischer Bakteriophage	H. Beims, TU Braunschweig, Inst. f. Mikrobiologie
HB16	<i>P. larvae</i> -spezifischer Bakteriophage	H. Beims, TU Braunschweig, Inst. f. Mikrobiologie
HBA	<i>P. larvae</i> -spezifischer Bakteriophage	H. Beims, TU Braunschweig, Inst. f. Mikrobiologie
HB $\chi$	<i>P. larvae</i> -spezifischer Bakteriophage	H. Beims, TU Braunschweig, Inst. f. Mikrobiologie
HBWf	<i>P. larvae</i> -spezifischer Bakteriophage	H. Beims, TU Braunschweig, Inst. f. Mikrobiologie

Bei den verwendeten Bienenvölkern handelte es sich um Völker von *Apis mellifera carnica* der Celler-Linie (eigenständige Troisek-Linie). Die Königinnen dieser Völker waren standbegattete Wirtschaftsköniginnen.

#### 4.4 Vektoren, Enzyme, Primer, Marker, Lösungen und Medien für die Zellbiologie

Tabelle 5 beinhaltet die, im Rahmen dieser Arbeit, verwendeten Vektoren.

**Tabelle 5: Verwendete Vektoren.**

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
pBC KS (+)	Plasmid mit $\alpha$ -Fragment der $\beta$ -Galactosidase, T3 und T7 Promotor, Cm <sup>R</sup>	Genomics Agilent
pGEM <sup>®</sup> T Easy	Lineares Plasmid mit 3'-terminalen Tyminüberhang an beiden Enden, $\alpha$ -Fragment der $\beta$ -Galactosidase, SP6 und T7 Promotor, Amp <sup>R</sup>	Promega
pSSBm106	Plasmid mit Tet <sup>R</sup> ; entspricht pSPYoch-hp	(Stammen <i>et al.</i> , 2010)

Für die molekularbiologischen Arbeiten wurden die in Tabelle 6 aufgeführten Enzyme verwendet.

**Tabelle 6: Verwendete Enzyme.**

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
Antarctic Phosphatase	Phosphatase	New England BioLabs Inc.
Bal31	Exonuklease (3' $\rightarrow$ 5')	New England BioLabs Inc.

BamHI	Restriktionsendonuklease Erkennungssequenz: G GATCC	New England BioLabs Inc.
Benzonase	Nuklease	Sigma Aldrich
BglII	Restriktionsendonuklease Erkennungssequenz: A GATCT	New England BioLabs Inc.
BspHI	Restriktionsendonuklease Erkennungssequenz: T CATGA	New England BioLabs Inc.
Dispase	Caseinhydrolysierendes Protein	Sigma Aldrich
DNase I	Desoxyribonuklease	New England Biolabs
EcoRI	Restriktionsendonuklease Erkennungssequenz: G AATTC	New England BioLabs Inc.
EcoRV	Restriktionsendonuklease Erkennungssequenz: GAT ATC	New England BioLabs Inc.
HindII	Restriktionsendonuklease Erkennungssequenz: A AGCTT	New England BioLabs Inc.
HotStarTaq <i>Plus</i> DNA Polymerase	DNA-abhängige DNA-Polymerase	Qiagen
Kollagenase	Kolloagenabbauende Protease	Sigma Aldrich
KpnI	Restriktionsendonuklease Erkennungssequenz: GGTAC C	New England BioLabs Inc.
LongAmp® <i>Taq</i> DNA Polymerase	DNA-abhängige DNA-Polymerase	New England BioLabs Inc.
Lysozym	Peptidoglykanspaltende Protease	Sigma Aldrich
Proteinase K	Peptidase	Sigma Aldrich
Q5® High-Fidelity DNA Polymerase	DNA-abhängige DNA-Polymerase	New England BioLabs Inc.
RNase A	Ribonuklease	Sigma Aldrich
SacI	Restriktionsendonuklease Erkennungssequenz: GAGCT C	New England BioLabs Inc.
Scal	Restriktionsendonuklease Erkennungssequenz: AGT ACT	ThermoFisher Scientific
T4-Ligase	DNA-Ligase	New England BioLabs Inc.
<i>Taq</i> DNA Polymerase	DNA-abhängige DNA-Polymerase	New England BioLabs Inc.
Trypsin	Gemisch dreier Peptidasen	Sigma Aldrich
XbaI	Restriktionsendonuklease Erkennungssequenz: T CTAGA	New England BioLabs Inc.
XhoI	Restriktionsendonuklease Erkennungssequenz: C TAGAG	New England BioLabs Inc.

Die verwendeten Oligonukleotide zur Amplifikation spezifischer Gensequenzen sind in Tabelle 7 aufgeführt.

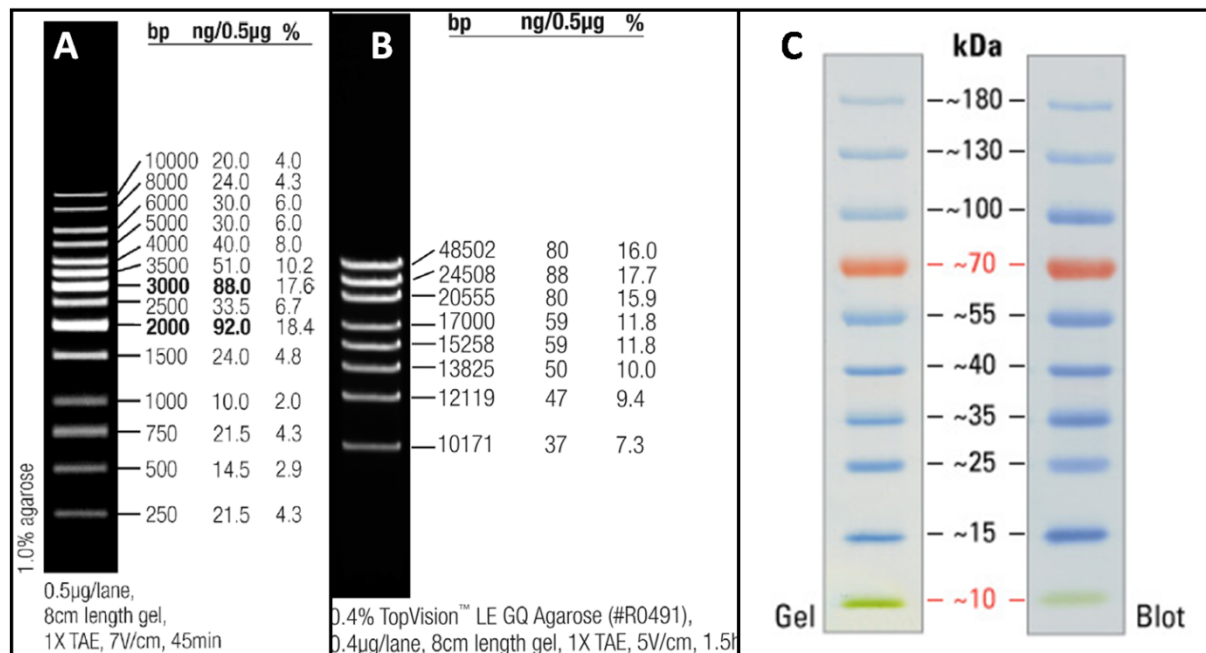
**Tabelle 7: Verwendete Oligonukleotide (Primer).**

Name	Sequenz	Referenz
10c2_Capsid-fw	ATG GAA GCT ATT CAA GCC CTG	diese Arbeit
10c2_Capsid-rv	TTA GGG AGT TTG TAC TTT GGC AAT C	diese Arbeit
10c2Ly-fw	ATG ATC GGT AAC AAT AAC GAG	diese Arbeit
10c2Ly-rv	TTA TTG GTT TTC TAT TTT GAC CA	diese Arbeit
AmiExpr-fw	ATG CCT CGA GAT GAT CGG TAA CAA	diese Arbeit

	TAA CGA G	
AmiExpr-rv	CTG GTA CCT TAT TGG TTT TCT ATT TTG ACC A	diese Arbeit
$\beta$ -Lac_1-fw	ATG AAG CAT TCT GGG GCA TA	diese Arbeit
$\beta$ -Lac_1-rv	CTA CCC TTT ATA AGC TGT TTT AAT GC	diese Arbeit
$\beta$ -Lac_2-fw	ATG ATA GAG ATG TCA AAA TAT CCA AAA	diese Arbeit
$\beta$ -Lac_2-rv	TCA TGC GAT TAC CTC CAA AT	diese Arbeit
dInt10c2	TTA TAC TTT TCA CTT AAA TAG GGT AAC AAT TGG GTA ACA CGA GGA TTG AGA GTA ATA CTT CTT TTC ATT TGG ATA GTG TGA ATA TTT TAA ACT TGC TCA T	diese Arbeit
eInt10c2-fw	ATA TAT CAG ATA ATG TAA CAT ATC AAA AAT TCT TGA TAA ATA AAG GGA TTT TAT ACT TTT CAC TTA AAT AGG GTA	diese Arbeit
eInt10c2-rv	CTA AAT CGG ATT AAA TTT GCC ATA AAA TTA TCT CTA GTT GAA AAA GAA GAA TGA GCA AGT TTA AAA TAT TCA CAC	diese Arbeit
ERIC 1R	ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C	(Versolovic <i>et al.</i> , 1994)
ERIC 2	AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G	(Versolovic <i>et al.</i> , 1994)
ItuA-fw	CTA GAA ATT TAG TTG AAG GGA A	diese Arbeit
ItuA-rv	ATG TAC ACC AAT CAA TTT CAT AC	diese Arbeit
ItuB-fw	CTA AAA ATC CAA TTC GAT TGT AC	diese Arbeit
ItuB-rv	ATG TCG GTA TTT AAA AAT CAG G	diese Arbeit
ItuC-fw	CTA TGA GCG TAC AAG AAC A	diese Arbeit
ItuC-rv	ATG TCA GAA TTT AAA CAG CAG	diese Arbeit
ItuDdo2	ATT TGA TGC TCG ATG AGT TTT TCT AAG ATG ATA AGG CTT ATA TTG GAG GAG A	diese Arbeit
ItuDdo_BamHI-rv	ATG GGA TCC ATG ATA AGG CTT ATA TTG GAG GA	diese Arbeit
ItuDdo-f_I	CGG GGT AAT CAC TTT TCG AG	diese Arbeit
ItuDdo-r_I	AAA CAT TCT CAA AGG GAT TTC TAA GAT GAT AAG GCT TAT ATT GGA GG	diese Arbeit
ItuD-fw	TTA TTT TAA GAT TTG CAG TTG TTC TTG AA	diese Arbeit
ItuD-rv	ATG AGT CTT GCT TTT TTA TTT CCT G	diese Arbeit
ItuDup1	GTT TCC CGT TGA ATA TGG CTC ATT CGG CTC CTC CGT CCT	diese Arbeit
ItuDup_BamHI-fw	ATG GGA TCC TCG GCT CCT CCG TCC TCA C	diese Arbeit
ItuDup-f_I	TCG ATT GTG AAT AGG ATG TAT TCA CTC GGC TCC TCC GTC CTC AC	diese Arbeit
ItuDup-r_I	GCC GAT GTA AAG GAA CGT GT	diese Arbeit
Km-full-R	ATG AGC CAT ATT CAA CGG GA	
Mpl 16S fw	GGA GAG GAG TTA AAA GGC GC	(Govan <i>et al.</i> , 1998)
Mpl 16S rv	TTA TCT CTA AGG CGT TCA AAG G	(Govan <i>et al.</i> , 1998)
NptI-R	TTA GAA AAA CTC ATC GAG CAT CAA AT	
Pla 16 S fw	AAG TCG AGC GGA CCT TGT GTT TC	(Govan <i>et al.</i> , 1999)

Pla 16 S rv	GTC TAT CTC AAA ACC GGT CAG AGG	(Govan <i>et al.</i> , 1999)
slnt10c2-fw	TTA GCG CGA TTT TGT AAC AAT	diese Arbeit
slnt10c2-rv	CAA TTG TAG CTC GCC AAC	diese Arbeit
sltuD_KO-fw	AGA ACA TCT TTA ATA CTC CAT CCT C	diese Arbeit
sltuD_KO-rv	CCA TAG TAT CCT CCT TAT AAG ACA AC	diese Arbeit
SP6	TAT TTA GGT GAC ACT ATA G	Promega
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	Promega
TetR-fw	GTG AAT ACA TCC TAT TCA CAA TCG	diese Arbeit
TetR-rv	TTA GAA ATC CCT TTG AGA ATG TTT	diese Arbeit
TetR_BamHI-fw	ATG GGA TCC GTG AAT ACA TCC TAT	diese Arbeit
	TCA CAA TCG	
TetR_BamHI-rv	ATG GGA TCC TTA GAA ATC CCT TTG	diese Arbeit
	AGA ATG TTT	

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die in Abbildung 2 aufgeführten DNA- und Proteinmarker verwendet.



**Abbildung 2: Verwendete DNA- und Proteinmarker.** A, GeneRuler™ 1kb DNA Ladder; B, GeneRuler™ High Range DNA Ladder; C, PageRuler Prestained Protein Ladder. Quelle: [www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Tyrocidine (Trcs) verwendet. Hierbei handelt es sich um Dekapeptide die von *Bacillus aneurinolyticus* produziert werden. Die verwendeten Trcs wurden von Johan Arnold Vosloo (Stellenbosch University) produziert, quantifiziert und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Bei den entsprechenden Substanzen handelte es sich um Trc extract (T<sub>E</sub>) und Trc mix (Trc<sub>Mix</sub>) und die Gramicidin-Kontrolle (GS).

## 4.5 Bakteriologische Methoden

### 4.5.1 Isolation und Identifizierung von *P. larvae*

*P. larvae* kann in Waben-, Brut und Futtermaterial sowie im Honig aus AFB-positiven Bienenvölkern nachgewiesen werden. Zur Isolation von *P. larvae* wurde entsprechendes Material im Verhältnis

1:1 (w/v) mit MilliQ gemischt und 5 min bei 95 °C im Wasserbad erhitzt (LAVES IB Celle, n.d.). Aus dieser Suspension wurden 200 µL auf Columbia-Schafblut-Agar (CSA[Oxoid BD]) ausplattiert und für 7 d bei 37 °C und 5% (v/v) CO<sub>2</sub> inkubiert. *P. larvae*-typische Kolonien wurden anschließend auf frische CSA-Platten überimpft, mittels 16S rRNA-PCR (Govan *et al.*, 1999) identifiziert und über eine rep-PCR unter Verwendung von ERIC-Primern (Genersch *et al.*, 2006) klassifiziert. Die Isolate wurden wie in 4.5.2 beschrieben konserviert.

#### 4.5.2 Kultivierung von Bakterien

*P. larvae* wurde auf CSA für 16-48 Stunden bei 37 °C und 5% (v/v) CO<sub>2</sub> angezogen. Anschließend erfolgte das Passagieren in „Brain-Heart-Infusion“-Medium (BHI) für eine Inkubation bei 37 °C und 16-24 Stunden bei 200 rpm. Die Zusammensetzung des BHI-Mediums ist in Tabelle 8 dargestellt.

**Tabelle 8: Zusammensetzung des Brain-Heart-Infusion-Mediums.**

<b>„Brain-Heart-Infusion“-Medium (BHI)</b>		
37 g	Hirn-Herz-Glucose-Bouillon	Roth
3 g	Hefeextrakt (Bacto™)	Oxiod BD
ad 1 L mit MilliQ auffüllen und autoklavieren		

*M. plutonius* wurde unter anaeroben Bedingungen in Basalmedium für *M. plutonius* (modifiziert nach Bailey, 1957) (Tabelle 9) in Anaerobentöpfen für 3-6 Tage bei 37 °C kultiviert. Anaerobe Bedingungen wurden mittels Anaerokult® A (Merck) hergestellt.

**Tabelle 9: Zusammensetzung des Basalmediums für *M. plutonius* (BMMP).**

<b>Basalmedium für <i>M. plutonius</i> (BMMP)</b>		
<b>Lösung 1:</b>		
10,0 g	Hefeextrakt (Bacto™)	Oxiod BD
100,0 mL	1 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (aq) pH 6,7	Roth
ad 900 mL mit MilliQ auffüllen und autoklavieren		
<b>Lösung 2:</b>		
100,0 g	Glukose	Roth
2,5 g	L-Cystein	Sigma-Aldrich
ad 500 mL mit MilliQ auffüllen und sterilfiltrieren		
<b>Lösung 3:</b>		
100,0 g	Saccharose	Roth
ad 500 mL MilliQ und sterilfiltrieren		
<b>BMMP:</b>		
900,0 mL	Lösung 1	
50,0 mL	Lösung 2	
50,0 mL	Lösung 3	

Zur Kultivierung von *E. coli* und *B. megaterium* wurde im Rahmen der Klonierungs- und Expressionsschritte jeweils „Luria-Bertani“/„Lysogeny Broth-Medium“ (LB) verwendet (Tabelle 10). Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C und 200 rpm (bei Flüssigmedium) und 5% (v/v) CO<sub>2</sub> (bei festen Medien). Den jeweiligen verwendeten Selektionsmarkern entsprechend wurden den Medium die Antibiotika Chloramphenicol (Cm) 5 µg/mL, Ampicillin (Amp) 100 µg/mL, Tetracyclin (Tet) 10 µg/mL oder Kanamycin (Km) 60 µg/mL zugegeben.

**Tabelle 10: Zusammensetzung des Luria-Bertani Mediums.**

<b>„Luria-Bertani“-Medium (LB)</b>		
10 g	Caseinpepton	Roth

5 g	Hefeextrakt (Bacto™)	Oxiod BD
5 g	NaCl	Roth
15 g	Agar (bei festen Medien)	Gerbu
ad 1 L mit MilliQ auffüllen und autoklavieren		

Die Kultivierung der weiteren verwendeten Bakterien (Tabelle 3) erfolgte gemäß den Beschreibungen der jeweiligen Bakterien nach <https://www.dsmz.de/catalogues/catalogue-microorganisms.html>.

#### 4.5.3 Kryokonservierung von Bakterien

Für die dauerhafte Konservierung von bakteriellen Reinkulturen wurden Kryokonserven erstellt. Hierzu wurden die Bakterien entsprechend ihrer Kultivierungsbedingungen (4.5.2) auf festen Medien angezogen und in 2 mL MilliQ resuspendiert. In einem 1,8 mL-Kryoröhrchen werden 500 µL 80% (v/v) Glycerin(aq) vorgelegt und mit 1 mL der Bakteriensuspension vermischt und bei -80 °C konserviert. Die Rekultivierung erfolgte bei Bedarf auf den bakterienspezifischen Medien unter den o.g. Kultivierungsbedingungen.

#### 4.5.4 Herstellung von *P. larvae*-Sporen

Zur Erzeugung von *P. larvae*-Sporen wurden 10 µL des entsprechenden Stammes mit 10<sup>4</sup> cfu/mL auf CSA ausplattiert und bei 37 °C und 5% (v/v) CO<sub>2</sub> für 21 d inkubiert. Anschließend wurden die anhaftenden Sporen in 5 mL MilliQ resuspendiert und in ein 15 mL-Schraubdeckelröhrchen überführt. Dieser Schritt wurde zwei weitere Male wiederholt, sodass pro Platte 15 mL Zellsuspension geerntet wurden. Die Sporen wurden bei 9.000 x g für 15 min bei 4 °C sedimentiert und vier Mal mit 5 mL MilliQ gewaschen. Die endgültige Sporensuspension wurde bei 4 °C gelagert.

#### 4.5.5 Reisolation von *P. larvae* aus infizierter Bienenbrut

Die Reisolation von *P. larvae* aus infizierter Bienenbrut erfolgte aus verstorbenen Larven der Phagentherapie (4.11.4.1). Hierzu wurden die verstorbenen Larven auf CSA ausplattiert und bei 37 °C und 5% (v/v) CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach zweitägiger Inkubation wurden die Ausstriche optisch auf Reinkultur überprüft und die Speziesidentität anhand einer spezifischen 16S rRNA-PCR durchgeführt (4.5.1). Die weitere Aufarbeitung der Sporen erfolgte wie beschrieben (4.5.4).

#### 4.5.6 Präparation von *P. larvae* für die Elektronenmikroskopie

Die Elektronenmikroskopie wurde zusammen mit Prof. Dr. Manfred Rohe (Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung GmbH) durchgeführt. Dabei wurden Aufnahmen mit dem Rasterelektronenmikroskop (REM) erstellt.

##### 4.5.6.1 Präparation vegetativer *P. larvae*-Zellen für die Elektronenmikroskopie

Von einer *P. larvae*-Vorkultur auf CSA wurde eine Einzelkolonie entnommen und mit dieser 50 mL BHI-Medium in einem 100 mL-Erlenmeyerkolben inokuliert. Die Kultivierung erfolgte UN bei 37 °C und 200 rpm. Aus dieser Kultur wurden 5 mL abgenommen und die darin enthaltenen Zellen bei 2.000 x g und 4 °C für 10 min geerntet. Das Zellsediment wurde in 2 mL BHI-Medium mit 5% (v/v) Paraformaldehyd(aq) (Electron Microscopy Sciences) und 2% (v/v) Glutaraldehyd(aq) resuspendiert und fixiert. Die Lagerung bis zur weiteren Präparation erfolgte bei 4 °C gelagert.

Für die Präparation der Zellen wurden 50 µL Poly-L-Lysin für 10 min auf ein rundes Deckgläschen (d=1,2 cm) gegeben. Das Deckglas wurde anschließend in MilliQ gewaschen und getrocknet. Auf die vorbereitete Oberfläche wurden 50 µL der fixierten Bakteriensuspension gegeben. Nach 10 min wurde



die Probe zweimal in TE-Puffer gewaschen. Die Entwässerung der Präparate erfolgte jeweils für 10 min auf Eis in einer aufsteigenden Acetonkonzentration in MilliQ [10% (v/v), 20% (v/v), 50% (v/v), 70% (v/v), 90% (v/v)] in einer Multiwellplatte mit 24 Reaktionsräumen. Für die abschließende Dehydrierung wurden die Proben zwei Mal bei RT für 10 min in Aceton in Glaspetrischalen gegeben. Danach erfolgte die Kritische-Punkt-Trocknung (CPD030), gefolgt vom Aufbringen der Proben auf die Probenhalter. Abschließend wurden die Proben mit Au/Pd „gesputtert“.

#### 4.5.6.2 Präparation von *P. larvae*-Sporen für die Elektronenmikroskopie

Für die Elektronenmikroskopie wurden die *P. larvae*-Sporen wie folgt präpariert: Zunächst erfolgte die Fixierung der Proben in 2% (v/v) Glutaraldehyd und 5% (v/v) Formaldehyd in Cacodylat-Puffer für 1 h auf Eis. Nach einem Waschschriff in TE-Puffer wurden die Sporen auf Deckgläschen, die zuvor mit Poly-L-Lysin beschichtet wurden aufgebracht. Die Entwässerung der Proben erfolgte in aufsteigender Acetonkonzentration (10, 30, 50, 70, 90% (v/v)), für jeweils 15 min auf Eis. Die Entwässerung in Aceton erfolgte für 15 min bei RT. Die Kritische-Punkt-Trocknung wurde mit CO<sub>2</sub>(l) vorgenommen. Abschließend wurden die Proben mit Gold „gesputtert“.

#### 4.5.7 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Präparation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen wurde der entsprechende Stamm zunächst üN mittels 9-Strich-Methode auf LB Medium bei 37 °C inkubiert. Eine Einzelkolonie wurde als Inokulum für 5 mL LB-Medium verwendet und üN bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Der Ansatz diente als Vorkultur (1 mL) für 100 mL LB. Diese Kultur wurde bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,6-0,8 bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Danach wurden die Zellen in zwei 50 mL-Schraubdeckelröhrchen á 50 mL aufgeteilt und 10 min auf Eis gelagert. Die Zellernte erfolgte bei 1.700 x g und 4 °C für 10 min. Das Zellsediment wurde in 10 mL eiskaltem 0,1 M RbCl<sub>2</sub> in 10% (v/v) Glycerin(aq) resuspendiert und für 15 min auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Zellen erneut gewaschen und abschließend in Volumina zu je 104 µL in 1,5 mL-Reaktionsgefäße überführt und bei -80 °C eingefroren.

#### 4.5.8 Herstellung von *B. megaterium*-Protoplasten

Zur Vorbereitung der *B. megaterium*-Zellen für die Transformation wurden 50 mL LB mit 1 mL einer Vorkultur des entsprechenden Stammes in LB angeimpft und üN bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1 inkubiert. Die Zellen wurden anschließend in ein 50 mL-Schraubdeckelröhrchen überführt und bei 2.700 x g und 4 °C für 15 geerntet. Das Zellsediment wurde in 5 mL frischem SMMP (Tabelle 11) resuspendiert und in ein 15 mL-Schraubdeckelröhrchen überführt. Die Protoplastierung der Zellen erfolgte nach Zugabe von Lysozymlösung (1 mg/mL in SMMP) bei 37 °C, sodass etwa 80% der Zellen als Protoplasten vorlagen. Die Protoplasten wurden bei 1.268 x g für 10 min geerntet und vorsichtig in 5 mL SMMP resuspendiert. Nach Wiederholung des Waschschriffes wurde der Ansatz in 750 µL 87% (v/v) Glycerin(aq) resuspendiert und in Volumina á 500 µL bei -80 °C gelagert.

Tabelle 11: Zusammensetzung des SMMP-Mediums.

SMMP-Medium		
2 x Antibiotic Medium No. 3 (AB3):		
7,00 g	Antibiotic Medium No. 3	Difco
	ad 200 mL mit MilliQ auffüllen und autoklavieren	
2 x SMM:		
1,16 g	Maleinsäure	Roth
0,80 g	NaOH	Merck
2,03 g	MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	Roth

85,58 g	Saccharose ad 300 mL mit MilliQ auffüllen pH 6,5 mit HCl einstellen ad 250 mL mit MilliQ auffüllen und sterilfiltrieren	Roth
<b>SMMP:</b>		
1 x Vol	2 x AB3	
1 x Vol	2 x SMM	

#### 4.5.9 Herstellung von *P. larvae*-Protoplasten

Zur Herstellung von *P. larvae*-Protoplasten wurde der entsprechende Stamm üN auf CSA bei 37 °C und 5% (v/v) CO<sub>2</sub> angezogen, um hiervon 50 mL BHI-Medium zu inokulieren. Diese Kultur wurde bei 37 °C und 200 rpm üN angezogen und die Zellen bei 5.000 x g und 4 °C für 10 min geerntet. Das Zellsediment wurde anschließend in 2 mL Lysozymlösung (c=100 mg/mL) resuspendiert und für 3 h bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 1.300 x g für 10 min geerntet und der Überstand dekantiert. Das Zellsediment wurde in 500 µL SMMP aufgenommen und mit 75 µL 85% (v/v) Glycerin(aq) gemischt. Die Lagerung der Protoplasten bis zur folgenden Transformation erfolgte bei 4 °C.

### 4.6 Virologische Methoden

#### 4.6.1 Isolation und Nachweis *P. larvae*-spezifischer Bakteriophagen

Zur Isolation *P. larvae*-spezifischer Bakteriophagen wurden potentiell phagenhaltige Proben in sterilem MilliQ resuspendiert und die Probe durch Zentrifugation für 5 min bei 12.000 x g von groben Verunreinigungen befreit. Der Überstand wurde über einen Sterilfilter (Porenweite: 0,2 µm) gegeben. Das so erhaltene Filtrat wurde mit dem gleichen Volumen 2 x BHI versetzt, mit *P. larvae* ERIC II (DSM 25430) inokuliert und für 2 d bei 200 rpm und 37 °C inkubiert.

Durch die Zugabe von 5% (v/v) CHCl<sub>3</sub> und der Zugabe von NaCl bis zu einer Konzentration von 0,5 M wurde der Wirt der Phagen abgetötet und eine Dissoziation der Phagenpartikel von bakteriellen Zelltrümmern herbeigeführt. Die wässrige Phase wurde bei 12.000 x g für 15 min zentrifugiert und der Überstand durch ein steriles Zellstofftuch filtriert. Die Lagerung der so erhaltenen Phagenlysate erfolgte bei 4 °C nach Zugabe von 1% (v/v) CHCl<sub>3</sub>.

Für den Nachweis der Bakteriophagen wurde *P. larvae* ERIC II (DSM 25430) flächendeckend auf CSA ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C und 5% (v/v) CO<sub>2</sub> inkubiert. Die bakteriellen Zellen wurden danach in 2,5 mL sterilem MilliQ resuspendiert und 2 mL dieser Suspension in ein 2 mL-Reaktionsgefäß überführt. Die Zellsuspension wurde für 5 min bei 5.000 x g gewaschen und anschließend in 0,5 mL sterilem MilliQ resuspendiert. Danach erfolgte die Bestimmung der OD<sub>600</sub> gegen Wasser. Der Nachweis der Phagen erfolgte im Plaquesassay. Hierzu wurden 4 mL BHI-Softagar aufgekocht und auf 56 °C im Wasserbad abgekühlt. Nach der Inokulation mit 100 µL *P. larvae* ERIC II (DSM 25430)-Suspension mit OD<sub>600</sub>=15 wurde der Softagar homogen auf einer „Columbia-Agar“-Platte (CA) (Tabelle 12) ausgebracht, 10 µL der Phagensuspension aufgetropft und die Platten bei 37 °C und 5% (v/v) CO<sub>2</sub> über Nacht inkubiert. Abschließend erfolgte eine Sichtung der Platten auf Plaques (Lysehöfe).

Tabelle 12: Zusammensetzung des Columbia-Agars (CA).

<b>„Columbia-Agar“ (CA)</b>		
42,5 g	Columbia-Agar (Basis) ad 1 L mit MilliQ auffüllen und autoklavieren	Roth

#### 4.6.2 Vermehrung und Quantifizierung *P. larvae*-spezifischer Bakteriophagen

Für die Vermehrung *P. larvae*-spezifischer Bakteriophagen wurden 5 mL BHI-Medium in ein RG vorgelegt, mit 500 µL Phagenlysate versetzt und mit 50 µL *P. larvae* ERIC II-Suspension mit einer  $OD_{600}=15$  (s. 4.6.1) inokuliert. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C und 200 rpm üN.

Zur Lyse des Wirtes (*P. larvae*) wurden 500 µL  $CHCl_3$  hinzugegeben und die Probe mittels Vortexen durchgemengt. Die wässrige Phase wurde in ein 2 mL-Reaktionsgefäß überführt und bei 12.000 x g für 10 min zentrifugiert. Aus dem Überstand wurden 1,5 mL in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 50 µL  $CHCl_3$  bei 4 °C für die weitere Verwendung gelagert.

Zur Quantifizierung der Phagen wurde das Phagenlysate aus der Vermehrungskultur in einer seriellen Verdünnung der Verdünnungsstufen  $10^{-1}$ - $10^{-12}$  in TM-Puffer verwendet (Tabelle 13). Diese Verdünnungsstufen wurden analog zum Plaquestest in 4.6.1 getestet. Für die Bestimmung der PFU/mL wurden die Einzelplaques der Verdünnungsstufen ausgezählt, in denen sich  $\leq 150$  Einzelplaques befanden. Der Phagentiter [PFU/mL] des Lysates errechnete sich dann aus dem Mittelwert der Titer der ausgezählten Verdünnungsstufen.

Tabelle 13: Zusammensetzung des TM-Puffers.

„Tris-Mg <sup>2+</sup> -Puffer“ (TM)		
10 mM	Tris-HCl pH 7,2 – 7,5	Roth
100 mM	NaCl	Roth
10 mM	MgCl <sub>2</sub>	Roth
5 mM	CaCl <sub>2</sub>	Roth

#### 4.6.3 Quantifizierung des Einflusses *P. larvae*-spezifischer Bakteriophagen auf das Wachstum von *P. larvae*

Zur Quantifizierung des Einflusses von Bakteriophagen auf das Wachstum von *P. larvae* wurden 50 mL BHI in einem 100 mL-Erlenmeyerkolben mit  $2,4 \times 10^7$  Zellen aus einer Vorkultur in BHI und  $4 \times 10^9$  pfu des jeweiligen Phagen inokuliert, das entspricht einer MOI von etwa 167. Die Kultivierung erfolgte für 24 h bei 37 °C und 200 rpm. Die optische Dichte der Kultur wurde stündlich in 1:10 (v/v) Verdünnungen bei einer Wellenlänge von  $\lambda=600$  nm spektralphotometrisch bestimmt. Anhand der  $OD_{600}$ -Werte wurde das bakterielle Wachstum anhand von Formel 1 mittels nicht-linearer Regression modelliert (Zwietering *et al.*, 1990).

**Formel 1: Modell zur Visualisierung der nicht-linearen Regression in einer Sättigungskurve.**  
 $N_0$ , Anfangswert;  $K$ , Kapazitätsgrenze;  $r$ , Wachstumsrate;  $t$ , Zeit.

$$f(t) = \frac{N_0 * K * e^{r * t}}{K + N_0 * e^{r * t} - 1}$$

#### 4.6.4 Bestimmung der Wurfzahl *P. larvae*-spezifischer Bakteriophagen

Um die Wurfzahl (neu gebildete Bakteriophagenpartikel pro infizierter Wirtszelle) eines *P. larvae*-spezifischen Bakteriophagen zu bestimmen wurden 400 mL BHI in einem 1 L-Erlenmeyerkolben vorgelegt und mit  $5 \times 10^8$  Zellen des *P. larvae* Genotypen ERIC II (DSM 25430) sowie  $1,25 \times 10^7$  pfu des jeweiligen Bakteriophagen inokuliert (MOI=0,025). Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 24 h. Parallel wurde eine Kontrollkultur ohne Bakteriophagen mitgeführt. Nach der Inkubation wurde die Anzahl der cfu von *P. larvae* in einem Aliquot von 2 mL beider Kulturen bestimmt. Hierüber wurde die Zellzahl des Wirtes in der Gesamtkultur ermittelt. Die Aufreinigung und Quantifizierung der Bakteriophagen erfolgte analog zu 4.6.2. Anhand dieser Werte konnte die Gesamtanzahl der pfu des

entsprechenden Bakteriophagen in der Kultur bestimmt werden. Mit diesen Werten konnte zunächst die Anzahl der Generationen des Wirtes (*P. larvae*) mit Formel 2 berechnet werden.

**Formel 2: Modell zur Berechnung der Generationszahl einer Bakterienkultur.**  $G_{P.larvae}$ , Generationszahl des Wirtes (*P. larvae*);  $cfu_0$ , Zellzahl der *P. larvae* zu  $t=0$  (Inokulum);  $cfu_t$ , Zellzahl der *P. larvae* an Zeitpunkt  $t$ .

$$G_{P.larvae}(t) = \sqrt[2]{\frac{cfu_0}{cfu_t}}$$

Durch die Vereinfachung der Abläufe in der Co-Kultur unter Annahme der gleichmäßigen Vermehrung der Bakteriophagen im Rahmen eines lytischen Kreislaufes und Infektion einer jeden Wirtszelle in der Kultur mit einem Bakteriophagen lässt sich aus Formel 2 wie folgt umstellen:

**Formel 3: Modell zur Berechnung der Generationszahl eines Wirtes unter Einbeziehung der pfu eines Bakteriophagen in einer Co-Kultur.**  $G_{P.larvae}$ , Generationszahl des Wirtes (*P. larvae*) an Zeitpunkt  $t$ ;  $pfu_0$ , pfu des Bakteriophagen zu  $t=0$  (Inokulum);  $pfu_t$ , pfu des Bakteriophagen an Zeitpunkt  $t$ .

$$G_{P.larvae}(t) = {}^{W_{Bakteriophage}}\sqrt[2]{\frac{pfu_0}{pfu_t}} \Leftrightarrow W_{Bakteriophage}(t) = \frac{\lg \frac{pfu_t}{pfu_0}}{\lg G_{P.larvae}}$$

Somit lässt sich die Wurfzahl der Bakteriophagen bestimmen.

#### 4.6.5 Präparation von Bakteriophagen für die Elektronenmikroskopie

Zur Vermehrung der Bakteriophagen für die Elektronenmikroskopie wurde *P. larvae* ERIC II (DSM 25430) über Nacht in 250 mL BHI-Medium bei 200 rpm und 37 °C angezogen. Von dieser Vorkultur wurden 50 mL in einen 1 L-Erlenmeyerkolben mit 400 mL BHI überführt, mit 1 mL Phagenlysat (4.6.2) versetzt und für 15 min bei RT inkubiert. Abschließend folgte eine Inkubation bei 120 rpm für 4 Tage bei 37 °C. Die Aufarbeitung der Phagenlysate erfolgte analog zu 4.6.2.

Für die weitere Aufkonzentration der Bakteriophagen wurde das Phagenlysat in 70 mL-Ultrazentrifugenröhrchen überführt und bei 4 °C für 1,5 h bei 100.000 x g zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurde das Sediment in 5 mL TM-Puffer resuspendiert und auf einen zuvor geschichteten CsCl-Gradienten in ein 13 mL-Ultrazentrifugenröhrchen gegeben. Hierbei wurden die CsCl-Lösungen wie folgt geschichtet: 1 mL  $\rho_{CsCl(aq)}=1,6$  g/mL; 1,5 mL  $\rho_{CsCl(aq)}=1,5$  g/mL; 3 mL  $\rho_{CsCl(aq)}=1,4$  g/mL; 3 mL  $\rho_{CsCl(aq)}=1,3$  g/mL. Die so geschichtete Probe wurde für 2,5 h bei 4 °C und 160.000 x g zentrifugiert. Am Ende der Aufreinigung wurden die aufkonzentrierten Bakteriophagen von oben her mit einer Pasteurpipette abgezogen und gegen 2.000 x Vol. TM-Puffer über Nacht bei 4 °C dialysiert. Die so präparierten Phagen wurden bei 4 °C gelagert.

#### 4.6.6 Elektronenmikroskopie der Bakteriophagen

Die Visualisierung der Bakteriophagen erfolgte mittels „Negative Staining“ im Transelektronenmikroskop. Hierzu wurde zunächst ein Stück Glimmer mit Kohle bedampft und anschließend ein Stück von ca. 2 x 2 mm verwendet.

Für die elektronenmikroskopische Untersuchung wurde das Phagenlysat aus 4.6.3 1:10 (v/v) mit MilliQ verdünnt.

Das vorbereitete Glimmerstück wurde in einem überstumpfen Winkel für 40 s in 20 µL des verdünnten Phagenlysates getaucht, dabei war darauf zu achten, dass die kohlebedampfte Seite nach oben wies. Das Präparat wurde im Folgenden auf gleiche Weise zunächst in TE-Puffer (Tabelle 14) und MilliQ für 1 s gewaschen und das verbleibende Waschmedium vorsichtig mit Filterpapier

abgezogen. Zur Kontrastierung wurde das Präparat in 20 µL 2% (w/v) UAc kontrastiert. Hierbei sank das Glimmerstück in den Tropfen, wohingegen die oben schwimmende Kohlefolie mit den anhaftenden Phagenpartikeln mit einem Nickelgrid (300 mesh) aufgenommen und an der Luft getrocknet wurde. Diese Präparate wurden für die Elektronenmikroskopie verwendet.

**Tabelle 14: Zusammensetzung des TE-Puffers.**

<b>„Tris-EDTA-Puffer“ (TE)</b>		
10 mM	Tris-HCl pH 8,0	Roth
100 mM	NaEDTA	Roth

#### **4.6.7 Transformation des Bakteriophagen HB10c2 in *P. larvae***

Für die Transformation des Bakteriophagen HB10c2 in *P. larvae*-Protoplasten (4.5.9) wurden zunächst 1,5 mL PEG-P in einem 15 mL-Schraubdeckelröhrchen vorgelegt. Anschließend wurden 2,5 µg des Deletionskonstruktes (4.9.8) mit den *P. larvae*-Protoplasten gemischt. Dieser Ansatz wurde in das PEG-P gegeben und für 2 min bei RT auf dem Rollenschüttler inkubiert. Nach der Zugabe von 5 mL SMMP wurden die Zellen bei 1.300 x g und 4 °C für 10 min sedimentiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Sediment in 500 µL SMMP resuspendiert. Der Transformationsansatz wurde danach mit  $1,8 \times 10^6$  pfu des Bakteriophagen HB10c2 versetzt und 1,5 h bei 37 °C inkubiert. Diesem Schritt folgte eine Inkubation von 45 min bei 37 °C und 200 rpm.

Aus dem Transformationsansatz erfolgte die Anreicherung und Quantifizierung der potentiell transformierten Bakteriophagen (4.6.2). Die Überprüfung auf eine erfolgreiche Transformation der Bakteriophagen erfolgte nach DNA-Isolation und entsprechender Screening-PCR; hierzu wurden Primer verwendet, die jeweils 150 bp downstream und upstream des entsprechenden Zielgens banden.

### **4.7 Mikrobiologische Methoden**

#### **4.7.1 Quantifizierung mikrobiellen Wachstums**

Zur Quantifizierung des mikrobiellen Wachstums wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von  $\lambda=600$  nm ( $OD_{600}$ ) spektralphotometrisch bestimmt. Bei der Verwendung von Flüssigkulturen erfolgte die Messung in 1:10 (v/v) Verdünnungen in Einwegküvetten mit einem Fassungsvermögen von 1 mL. Im Rahmen der MHK-Bestimmung (4.7.3) wurde das mikrobielle Wachstum direkt in den Multiwellplatten bestimmt. Die Modellierung des mikrobiellen Wachstums erfolgte anhand von Formel 1.

#### **4.7.2 Bestimmung von Sporen- und Bakterienkonzentrationen**

Für die Bestimmung der Sporenkonzentration wurde eine Probe (4.5.4) von 50 µL bei 65 °C für 15 min hitzeaktiviert und in einer seriellen Verdünnungsreihe auf CSA ausplattiert. Die Inkubation erfolgte bei den *P. larvae*-spezifischen Bedingungen für 2 d. Abschließend wurde die cfu/mL der Suspension bestimmt.

Um die Konzentration koloniebildender Einheiten (cfu) einer Bakteriensuspension zu bestimmen wurden serielle Verdünnungen in einem Volumen von 100 µL der Stufen  $10^{-1}$ - $10^{-12}$  in einer 96-Multiwellplatte hergestellt und 10 µL der jeweiligen Verdünnungsstufe als Tropfen auf eine quadratische Petrischale (Seitenlänge: 12 cm) im oberen Bereich aufgetropft. Durch Senkrechtstellen der Platte wurde die Probe als „Streifen“ über die Plattenlänge verteilt und anschließend bei den entsprechenden Kultivierungsbedingungen (4.5.2) inkubiert. Die Bestimmung Bakterienkonzentration

(cfu/mL) erfolgte durch Auszählen der Kolonien in den jeweiligen Verdünnungsstufen und der Berechnung des entsprechenden Mittelwertes.

#### 4.7.3 Minimale Hemmkonzentration (MHK)

Für die Bestimmung der MHK wurden die bereitgestellten Trecs (Tyrothricin ( $T_E$ ) und Tyrocidin-Mix ( $T_{Mix}$ )) und die Gramacidin-Kontrolle (GS) (je 210 µg/Flasche) in 105 µL 30% (v/v) EtOH(aq) gelöst.

Für die MHK wurde eine Verdünnungsplatte wie folgt vorbereitet: Die Spalten 1 und 2, sowie die Zeilen B-H der Spalten 3, 6 und 9 einer 96-Well-Multiwellplatte wurden mit 100 µL 15% (v/v) EtOH(aq) befüllt. Die Reaktionsräume A3, A6 und A9 wurden mit 100 µL MilliQ gefüllt. In A3 wurden 100 µL  $T_{Mix}$  pipettiert, 100 µL  $T_E$  in A6 und 100 µL GS in A9. Abschließend wurden die Substanzen in den jeweils folgenden Reaktionsräumen der entsprechenden Spalten 1:1 (v/v) seriell verdünnt.

Zur Bestimmung der MHK wurden 90 µL BHI-Medium in Spalte 1 der Testplatte vorgelegt. Die entsprechenden Testorganismen wurden in BHI-Medium üN bei 37 °C und 200 rpm angezogen. Die Zellsuspensionen wurden danach auf eine  $OD_{600}$  von 0,2 eingestellt. Von dieser Suspension wurden 90 µL in den Spalten 2-12 vorgelegt. Die Spalten 1 (Mediumkontrolle) sowie 2 und 12 (Wachstumskontrolle) wurden mit 10 µL aus den entsprechenden Spalten der Vorbereitungsplatte befüllt. Die Spalten 3-11 wurden mit 10 µL der Verdünnungen aus der Vorbereitungsplatte versehen (Spalten 2-5  $T_{Mix}$ ; 6-8,  $T_E$ ; 9-11 GS).

Die Inkubation der Testplatten erfolgte bei 37 °C und 600 rpm üN. *M. plutonius* wurde unter anaeroben Bedingungen (Anaerocult® A) bei 37 °C für 7 d stehend inkubiert. Abschließend wurde die  $OD_{595}$  der jeweiligen Reaktionsansätze bestimmt und die Ergebnisse zur Auswertung an Johan Arnold Vosloo (Stellenbosch University) geschickt.

### 4.8 Zellbiologische Methoden

#### 4.8.1 Isolation primärer Darmepithelzellen aus *A. mellifera*-Puppen

Für die Interaktionsstudien von *P. larvae* mit Mitteldarmepithelzellen aus *A. mellifera* mussten zunächst primäre Darmepithelzellen isoliert werden. Als Ausgangspunkt hierfür dienten u. a. Hilfestellungen und Medienrezepte von Michael Goblirsch (University of Minnesota) (Goblirsch *et al.*, 2013; Human *et al.*, 2013; Munderloh and Kurti, 1989).

Zunächst wurde ein Larvenassay durchgeführt, in dem die Larven die entsprechenden Futterlösungen ohne Zusätze erhielten (s. 4.11.2). An  $d_{16}$  wurden die aufgerichteten Puppen (ohne Pigmentierung der Augen) entnommen und nach Oberflächensterilisation in 10% (v/v)  $H_2O_2$  und anschließendem Waschen in MilliQ auf eine Paraffinplatte gelegt. Die unteren zwei Segmente des Abdomens wurden mit einer Schere vorsichtig entfernt und der Abdomeninhalt durch Aufdrücken eines flachen Spatels herausgedrückt. Je zehn grünlich gefärbte Mitteldärme wurden in ein 2 mL-Reaktionsgefäß mit 2 mL PBS (4 °C) gegeben.

Zur Dissoziation des Gewebes wurde anschließend das PBS qualitativ abgenommen und die Mitteldärme in 1 mL Dissoziationsmedium (Tabelle 15) mit einem Spatel grob homogenisiert. Diesem Schritt folgten drei Inkubationen zu je 45 min bei 4 °C, 33 °C und 4 °C. Danach wurde der Ansatz bei 300 x g zentrifugiert, der Überstand vorsichtig entfernt und das Sediment in 400 µL AmE-711-Medium (Tabelle 15) resuspendiert. Abschließend wurden 100 µL der Zellsuspension in einen

Reaktionsraum einer 24-Well-Platte gegeben, deren Reaktionsräume zuvor für 2 h mit 5% (w/v) Gelatine beschichtet wurden. Die Adhäsion der Zellen erfolgte bei 33 °C für 20 min.

Tabelle 15: Zusammensetzung der Medien für die Isolation und Kultivierung von primären Darmepithelzellen aus *A. mellifera*.

<b>Zusammensetzung der Medien und Lösungen zur Zellisolation</b>		
<b>Dissoziationsmedium:</b>		
96,77% (v/v)	Trypsin/EDTA	Promocell
1,08% (v/v)	100 x Antibiotic Antimycotic Solution	Sigma-Aldrich
1,08% (v/v)	Kollagenase	Sigma-Aldrich
1,08% (v/v)	Dispase in 5 mM CaAC(aq) und 10 mM NaAC(aq)	Sigma-Aldrich
<b>Minerallösung A:</b>		
0,841 mM	CoCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich
0,801 mM	CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	Roth
9,466 mM	MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich
6,956 mM	ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	Merck
<b>Minerallösung B:</b>		
0,283 mM	NaMoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich
<b>Minerallösung C:</b>		
1,325 mM	HNaO <sub>3</sub> Se	Fluca
<b>Minerallösung D:</b>		
1,00% (v/v)	Minerallösung A	
1,00% (v/v)	Minerallösung B	
1,00% (v/v)	Minerallösung C	
1,00% (w/v)	Glutathionin (reduziert)	Sigma-Aldrich
1,00% (w/v)	Ascorbinsäure	Roth
0,05% (w/v)	FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O ad 100% MilliQ	Roth
<b>Vitaminstock:</b>		
0,01% (w/v)	p-Aminobenzoessäure	Sigma-Aldrich
0,05% (w/v)	Cyanocobalamin (B <sub>12</sub> )	Roth
0,01% (w/v)	d-Biotin ad 100% MilliQ	Roth
<b>L-15C-Medium:</b>		
1 x	L15-Medium (Leibowitz)	Sigma-Aldrich
0,0449% (w/v)	L-Asparaginsäure	Roth
0,0500% (w/v)	L-Glutamin	Sigma-Aldrich
0,0450% (w/v)	L-Prolin	Roth
0,0490% (w/v)	L-Glutaminsäure	Merck
0,0449% (w/v)	α-Ketoglutarinsäure	Sigma-Aldrich
1,8018% (w/v)	Glukose	Roth
0,0100% (v/v)	Minerallösung D	
0,0100% (v/v)	Vitaminstock	
0,0050% (v/v)	10 N NaOH(aq) auf pH 5,5 – 6,5 einstellen, ad 100% MilliQ	Riedel-de Haen
<b>AmE-711-Medium:</b>		
10,0000% (v/v)	FCS	Biochrom
5,0000% (v/v)	TPB-Medium	Oxoid
0,1250% (v/v)	1 M HEPES(aq)	Roth
0,0075% (w/v)	NaHCO <sub>3</sub>	Merck
68,0000% (v/v)	L-15C-Medium ad 100% MilliQ	

#### 4.8.2 Kultivierung primärer Darmepithelzellen aus *A. mellifera*

Der Isolation primärer Darmepithelzellen aus *A. mellifera* folgte die Kultivierung dieser Zellen. Nachdem die primären Zellen adhärent waren, wurden in jeden Reaktionsraum der Multiwellplatte (4.8.1) 600 µL AmE-711-Medium mit einer finalen Konzentration von 1 x Antibiotic Antimycotic Solution (Sigma-Aldrich) und 100 µg/mL Chloramphenicol gegeben. Nach 16 h wurden die Zellen zweimal mit 1 mL PBS (37 °C) gewaschen und in 1 mL frischem Medium weiterkultiviert. Eine visuelle Kontrolle der Kulturen und Medienwechsel erfolgten täglich.

### 4.9 Molekularbiologische Methoden

#### 4.9.1 DNA-Isolation aus Bakteriophagen

Die DNA der Bakteriophagen wurde mittels Phenolextraktion isoliert. Hierzu wurden 500 µL Phagenlysat (4.6.2 oder 4.6.3) verwendet.

Bei der Verwendung von Phagenlysat nach 4.6.2 wurde das Phagenlysat mit 1 µL DNase I (10 mg/mL) und 2 µL RNase A (10 mg/mL) für 1 h bei 37 °C inkubiert. Diesem Schritt folgte die Zugabe von 11,5 µL 20% (w/v) SDS(aq) und 4,5 µL Proteinase K (20 mg/mL). Die Inkubation erfolgte für 30 min bei 37 °C.

Die Phenolextraktion erfolgte zwei Mal mit 500 µL Phenol/CHCl<sub>3</sub> im Verhältnis von 1:1 (v/v). Nach dem Durchmischen beider Phasen wurde eine Phasentrennung bei 10.000 x g für 5 min herbeigeführt und die wässrige Phase (ohne Interphase) erneut extrahiert. Abschließend erfolgte ein Waschschriff mit 500 µL CHCl<sub>3</sub>.

Zur Ausfällung der DNA wurde eine EtOH-Fällung durchgeführt. Die wässrige Phase wurde in ein 2 mL-Reaktionsgefäß überführt, mit 0,1 x Vol. 3 M NaAc versetzt und mit 1,5 x Vol. EtOH abs. 10 min auf Eis ausgefällt. Die DNA wurde bei max. rpm für 10 min sedimentiert und mit 1 x Vol. 70% (v/v) EtOH gewaschen. Final wurde die DNA in 0,1 x Vol. MilliQ gelöst und die Konzentration im NanoDrop® bestimmt.

#### 4.9.2 Restriktionskartierung der Phagen-DNA

Für die Restriktion der isolierten Phagen-DNA (4.9.1) wurde jeweils 1 µg der DNA in einem Gesamtvolumen von 10 µL in CutSmart-Puffer mit 10 U Restriktionsenzym für 2,5 h bei 37 °C restringiert.

Der gesamte Restriktionsansatz wurde anschließend mit 2 µL 6 x Loading Dye (LD) (Tabelle 17) versetzt und in einem 1% (w/v) Agarosegel in Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE) (Tabelle 16) bei einer Spannung von 120 V für 30 min aufgetrennt. Die Visualisierung der DNA-Fragmente erfolgte nach 10 min Färbung in 0,001% (v/v) Ethidiumbromid(aq) unter UV Licht ( $\lambda=230$  nm). Die qualitative Größeneinschätzung der DNA-Fragmente erfolgte über den DNA-Marker.

**Tabelle 16: Zusammensetzung des TAE-Puffers.**

„50 x Tris-Acetat-EDTA-Puffer“ (50 x TAE)		
1,5M	Tris-HCl	Roth
37,5 M	NaEDTA	Roth
50,0 M	Eisessig	VWR



**Tabelle 17: Zusammensetzung des LD-Puffers.**

<b>„6 x Loading-Dye“ (6 x LD)</b>		
350 µM	Bromphenolblau	Roth
450 µM	Xylencyanol FF	Roth
50 % (v/v)	Glycerin	Roth

### 4.9.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

#### 4.9.3.1 Verwendung der LongAmp® *Taq* Polymerase

Zur Amplifikation größerer DNA-Fragmente (>8 kbp) wurde die LongAmp® *Taq* Polymerase von NEB verwendet.

Der Reaktionsansatz setzte sich, an dem Herstellerprotokoll orientiert, wie folgt zusammen: 1 x LongAmp *Taq* Reaction Buffer; 300 µM dNTPs; 400 nM der verwendeten Primer (jeweils); 0,1 U/µL LongAmp® *Taq* Polymerase; 5 ng DNA-Template zusammen und ad final volume MilliQ. Das PCR-Programm bestand aus folgenden Schritten: Initiale Denaturierung, 94 °C, 30 s; 30 Cyclen á Denaturierung, 94 °C, 30 s; Annealing\*, 30 s; Elongation, 65 °C, 50 s/kb; finale Elongation, 65 °C, 10 min; Lagerung der Amplifikate bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C.

\*Die Annealingtemperatur errechnete sich aus der Sequenz der jeweils verwendeten Primer anhand des Onlinetools des Herstellers: <http://tmcalculator.neb.com/#/>.

Diese Polymerase zählt zur Familie der *Taq*-Polymerasen und erzeugt somit dA-Überhänge am 3'-Ende der Amplifikate, sodass diese nach der Aufreinigung direkt für die Klonierung in pGEM® T Easy verwendet werden konnten.

#### 4.9.3.2 Verwendung der Q5® High-Fidelity DNA Polymerase

Zur Amplifikation kleinerer bis mittlerer DNA-Fragmente (<8 kbp), bzw. von DNA-Fragmenten für eine anschließende Klonierung oder Sequenzierung wurde die Q5® High-Fidelity DNA Polymerase von NEB verwendet.

Orientiert an den Herstellerangaben setzten sich die PCR-Reaktionsansätze aus folgenden Komponenten zusammen: 1 x Q5 Reaction Buffer; 200 µM dNTPs; 500 nM der verwendeten Primer (jeweils); 0,02 U/µL Q5® High-Fidelity DNA Polymerase und 5 ng DNA-Template.

Das PCR-Programm folgte entsprechend den Herstellerangaben folgenden Parametern: Initiale Denaturierung, 98 °C, 30 s; 35 Cyclen Denaturierung, 98 °C, 10 s; Annealing\*, 20 s; Elongation, 72 °C, 30 s/kb; finale Elongation, 72 °C, 2 min; Lagerung der Amplifikate bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C.

\*Die Annealingtemperatur errechnete sich aus der Sequenz der jeweils verwendeten Primer anhand des Onlinetools des Herstellers: <http://tmcalculator.neb.com/#/>.

#### 4.9.3.3 Verwendung der *Taq* DNA Polymerase zur Adenylierung

Sofern Amplifikate aus Reaktionen mit der Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (4.9.3.2) für die Klonierung in den Vektor pGEM® T Easy verwendet werden sollten, mussten diese zunächst mit dA-Überhängen am 3'-Ende der Amplifikate versehen werden. Hierzu wurde eine Adenylierung der Fragmente mit der *Taq* DNA Polymerase von NEB durchgeführt. Die Amplifikate aus der vorhergehenden PCR (4.9.3.2) wurden zunächst mit dem QIAquick® PCR Purification Kit von QIAGEN aufgereinigt und in 30 µL MilliQ von der Säule eluiert.

Der Reaktionsansatz hierfür setzte sich wie folgt zusammen: 1 x ThermoPol® Buffer; 2 mM dATP; 0,2 U/μL *Taq* DNA Polymerase; 50 ng DNA-Template und ad 50 μL MilliQ. Die Adenylierung erfolgte bei 72 °C für 20 min und anschließender Lagerung der Produkte bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung.

#### **4.9.4 Ligation von Fragmenten in Vektoren**

Die Ligationen wurden in einem Reaktionsvolumen von 20 μL durchgeführt. Der entsprechende Ligationsansatz setzte sich wie folgt zusammen: 1 x T4 DNA Ligase Buffer (NEB); 400 U T4 DNA Ligase; 50 ng Vektor; 150 ng Insert; ad 20 μL MilliQ.

Die Ligation erfolgte bei RT für 2 h.

Die Vektoren wurden (sofern nötig) vor der Ligation über die entsprechenden Restriktionsendonukleasen linearisiert und zur Verhinderung der Religation dephosphoryliert. Die Reaktionsansätze hierzu setzten sich wie folgt in Volumina á 20 μL zusammen: 1 x CutSmart Buffer (NEB); 10 μg Vektor (zirkular); 10 U Restriktionsendonuklease; 5 U Antarctic Phosphatase; ad 20 μL MilliQ. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 2 h. Abschließend wurde der Restriktionsansatz über das QIAquick® PCR Purification Kit (QIAGEN) aufgereinigt.

#### **4.9.5 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten**

Die Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte für kleine Fragmente (<10 kbp) in 1% (w/v) Agarosegelen in 1 x TAE bei einer Feldspannung von 24 V/cm für 30 min. Größere Fragmente (>10 kbp) wurden in 0,5% (w/v) Agarosegelen in 1 x TAE bei einer Feldspannung von 5 V/cm für 2,5 h aufgetrennt.

Anschließend wurden die Gele für 15 min in 0,001% (v/v) Ethidiumbromid(aq) gefärbt und unter UV-Licht ( $\lambda=230$  nm) die DNA-Fragmente visualisiert.

#### **4.9.6 Herstellung von Deletionskonstrukten zur Erstellung von *P. larvae*- Mutanten**

Für die Herstellung der Deletionskonstrukte zum Knock-out in *P. larvae* wurden die Sequenzen der entsprechenden Gene nebst der 1,5 kbp flankierenden Regionen der Gene verwendet. Hierzu setzte sich das Deletionskonstrukt aus einer Antibiotikaresistenz und den flankierenden Regionen des Gens zusammen.

##### **4.9.6.1 Erstellung der Knock-out-Konstrukte mittels Joining-PCR**

Zur Erstellung der Deletionskonstrukte mittels Joining-PCR wurden zunächst die Antibiotikaresistenz und die flankierenden Regionen des Gens mittels PCR amplifiziert und die Amplifikate aufgereinigt. Die Primer für die flankierenden Regionen erhielten an der zum Gen gewandten Seite einen Überhang mit Sequenzüberhang der Antibiotikaresistenz. In der anschließenden Joining-PCR wurden die beiden Amplifikate der Flanken und die Antibiotikaresistenz in einem Massenverhältnis von 1:1:3 als Templates verwendet. Als Primer dienten die zum Gen gewandten Primer der flankierenden Regionen. Die Produkte dieser Joining-PCR wurden in einem Agarosegel aufgetrennt (4.9.5) und das Zielprodukt mittels QIAquick® Gel Extraction Kit (QIAGEN) aufgereinigt. Anschließend erfolgte eine Adenylierung des Zielfragmentes (4.9.3.3) mit anschließender Ligation in den Vektor pGEM®T Easy (4.9.4). Im Folgenden wurde das Plasmid in *E. coli* transformiert (4.9.7) und nach der Vermehrung hieraus mit dem QIAprep® Spin Miniprep Kit (QIAGEN) isoliert. Der isolierte Vektor diente dann als Template zur Amplifikation des Knock-out-Konstruktes, welches dann in *P. larvae* transformiert wurde.

#### 4.9.6.2 Erstellung der Konstrukte über Restriktion und Ligation

Für die Erstellung der Deletionskonstrukte mittels Restriktion und Ligation wurde zunächst das entsprechende Gen mit den flankierenden Regionen amplifiziert, adenyliert (4.9.3.3), in den Vektor pGEM®T Easy ligiert (4.9.4) und in *E. coli* transformiert (4.9.7).

Parallel dazu wurde die Antibiotikaresistenz mit Primern amplifiziert, die jeweils am 5'-Ende eine Restriktionsschnittstelle und einen 3 nt-Überhang aufwiesen. Die Aufreinigung erfolgte mit dem QIAquick® PCR Purification Kit (QIAGEN). Beim Design der Primer war darauf zu achten, dass die verwendete Erkennungssequenz der Restriktionsendonuklease weder in den flankierenden Regionen und dem Vektor, noch in der Antibiotikaresistenz vorkam.

Aus *E. coli* wurde der Vektor mit dem QIAprep® Spin Miniprep Kit (QIAGEN) isoliert. Danach erfolgte eine inverse PCR des Vektors. Hierzu wurden die vom Gen wegweisen Primer der Flanken mit verwendet, wobei diese am 5'-Ende die gleiche Restriktionsschnittstelle wie die Antibiotikaresistenz und einen 3 nt-Überhang aufwiesen.

Die aufgereinigten Fragmente (Antibiotikaresistenz und invers amplifizierter Vektor) wurden mit der entsprechenden Restriktionsendonuklease restringiert, aufgereinigt, miteinander ligiert (4.9.4) und wiederum in *E. coli* transformiert. Das fertige Deletionskonstrukt wurde abschließend mit den zum Gen gewandten Primern der Flanken amplifiziert, aufgereinigt und für die Transformation in *P. larvae* verwendet.

#### 4.9.7 Transformation von chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen

Für die Transformation wurden 50 µL der präparierten *E. coli* Zellen (4.5.7) mit dem aufgereinigten Transformationsprodukt (20 µL) vermischt und 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend folgte ein Hitzeschock 42 °C für 45 s gefolgt von einer Inkubation auf Eis für 2 min. Dem Transformationsansatz wurde danach 1 mL vorgewärmtes (37 °C) LB-Medium hinzugefügt und für 1 h bei 37 °C und 300 rpm inkubiert. Die Selektion der Transformanten erfolgte auf speziell vorbereiteten LB-Platten, die als Selektionsmarker Ampicillin (100 µg/mL), zur Induktion des Promotors für die Blau-Weiß-Selektion Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG, 0,5 mM) und als Substrat hierzu 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid (X-Gal, 80 µg/mL) enthielten. Von dem Transformationsansatz wurden je 10, 20, 50, 100 und 200 µL ausplattiert und üN bei 37 °C inkubiert. Durch die Insertion des zu klonierenden Fragmentes in das *lacZ'*-Gen des Vektors können entsprechende Transformanten keine funktionsfähige β-Galactosidase mehr bilden, wodurch diese Klone nicht mehr in der Lage sind das X-Gal in 5,5'-Dibromo-4,4'-dichloro-Indigo und Galaktose zu spalten, sie erscheinen daher als weiße Kolonien.

#### 4.9.8 Herstellung von Deletionskonstrukten für den Bakteriophagen HB10c2

Die Erstellung der Deletionskonstrukte für den Bakteriophagen HB10c2 erfolgte durch Abwandlung bereits publizierter Verfahren (Marinelli *et al.*, 2008).

Zunächst wurde ein 100 nt Deletions-Oligonukleotid erstellt, welches sich aus den 50 nt der flankierenden Regionen des Zielgens zusammensetzte. Dieses Deletions-Oligonukleotid wurde mit Elongationsprimern, die 25 nt des Deletionsoligonukleotids und weitere 50 nt der entsprechenden Flanke abdeckten amplifiziert, sodass ein PCR-Produkt von 200 bp amplifiziert wurde. Dieses Produkt wurde für die Transformation des Bakteriophagen in *P. larvae* aufgereinigt.

#### 4.9.9 Transformation von *B. megaterium*-Protoplasten

Zur Transformation der *B. megaterium*-Protoplasten wurden zunächst 5 µg DNA in Wasser resuspendiert und 1,5 mL PEG-P in einem 15 mL-Schraubdeckelröhrchen vorgelegt. Anschließend wurden 500 µL Protoplastensuspension (4.5.8) mit der DNA gemischt und die Suspension in das vorgelegte PEG-P gegeben. Der Ansatz wurde 2 min bei RT inkubiert und danach vorsichtig mit 5 mL SMMP gemischt. Die Zellen wurden bei 1.268 x g bei RT für 10 min geerntet, in 500 µL SMMP resuspendiert und in ein Reaktionsgefäß überführt. Dieser Ansatz wurde zunächst für 45 min bei 30 °C und anschließend weitere 45 min bei 30 °C und 300 rpm inkubiert. Die Kultur wurde anschließend in ein Schraubdeckelröhrchen mit 2,5 mL CR5-Topagar (Tabelle 18) überführt, homogenisiert und auf vorgewärmten LB-Platten mit dem entsprechenden Selektionsmarker (Antibiotikum) verteilt. Die Inkubation erfolgte üN bei 30 °C. Gewachsene Kolonien wurden zunächst auf LB-Platten mit Selektionsmarker überführt und anschließend weiter charakterisiert.

Tabelle 18: Zusammensetzung des CR5-Agars.

<b>CR5-Topagar:</b>		
<b>Lösung A:</b>		
51,50 g	Saccharose	Roth
3,25 g	MOPS	Roth
0,30 g	NaOH	Merck
	ad 250 mL mit MilliQ auffüllen	
	pH 7,3 mit NaOH einstellen und sterilfiltrieren	
<b>Lösung B:</b>		
2,00 g	Agar	Gerbu
0,10 g	Casamino-Acids	Sigma-Aldrich
5,00 g	Hefeextrakt	Oxoid BD
	ad 142,5 mL mit MilliQ auffüllen und autoklavieren	
<b>8 x CR5-Salze:</b>		
1,25 g	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Roth
50,00 g	MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	Roth
0,25 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Roth
14,57 g	CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	Roth
	ad 625 mL mit MilliQ auffüllen und autoklavieren	
<b>CR5-Topagar (2,5 mL):</b>		
1,250 mL	Lösung A	
0,713 mL	Lösung B	
0,288 mL	8 x CR5-Salze	
0,125 mL	12% (w/v) L-Prolin(aq)	Roth
0,125 mL	20% (w/v) Glukose(aq)	Sigma-Aldrich

#### 4.9.10 Transformation von *P. larvae*

Die Transformation von *P. larvae* erfolgte nach Abwandlung bereits publizierter Protokolle (Murray and Aronstein, 2008). Zunächst wurde *P. larvae* in MYPGP-Medium von einer Vorkultur auf CSA angezogen und bis zu einer OD<sub>600</sub> ≤ 0,7 bei 37 °C und 250 rpm kultiviert. Danach wurde der Ansatz für 15 min auf Eis inkubiert und die Zellen anschließend bei 4.000 x g und 4 °C für 20 min geerntet.

Zur Vorbereitung der Elektroporation wurden die Zellen in 1 x Vol., 0,5 x Vol. und 0,25 x Vol. EB (Tabelle 19) bei 4.000 x g und 4 °C für jeweils 15 min gewaschen. Die Zellen wurden abschließend in 0,004 x Vol. eiskalter EB-Lösung aufgenommen und bis zur eigentlichen Elektroporation auf Eis gelagert.

Für die Elektroporation wurden 40 µL der vorbereiteten Zellsuspension mit 160 ng Plasmid gemischt und 15 min auf Eis inkubiert. Dieser Ansatz wurde in eine Elektroporationsküvette (d=0,1 cm) gegeben und bei 12,5 kV/cm elektroporiert. Anschließend wurde 1 mL MYPGP-Medium (Tabelle 19) zu dem Ansatz gegeben gefolgt von einer Inkubation bei 35 °C und 180 rpm für 18 h. Die Selektion der Klone erfolgte auf MYPGP mit entsprechendem Antibiotikum bei einer Inkubation von 3 d bei 37 °C und 5% (v/v) CO<sub>2</sub>.

**Tabelle 19: Zusammensetzung der Medien für die Transformation von *P. larvae*.**

Medien und Lösungen für die Transformation von <i>P. larvae</i> :		
MYPGP-Medium:		
10,00 g	Müller-Hinton-Bouillon	Roth
15,00 g	Hefeextrakt	Oxoid BD
3,00 g	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Roth
01,00 g	NaPyruvat	Roth
20,00 g	Agar	Gerbu
	ad 980 mL MilliQ und autoklavieren	
	nach autoklavieren 10% (w/v) Glucose(aq) zugeben	
Elektroporationslösung (EB):		
0,625 M	Saccharose	Roth
0,100 M	MgCl <sub>2</sub>	Roth

## 4.10 Proteinbiochemische Methoden

### 4.10.1 Präparation von Bakteriophagenproteinen

Zur Präparation der Bakteriophagenproteine wurden 50 µL der Phagensuspension nach vorheriger Ultrazentrifugation und Dialyse (4.6.5) mit 50 µL 10 M LiCl versetzt und 10 min bei 46 °C inkubiert, anschließend wurde dem Ansatz 1 mL TM-Puffer zugegeben. In einem weiteren Schritt wurden 11 µL 1 M MgCl<sub>2</sub> und 2 µL DNaseI (10 mg/mL) zugegeben gefolgt von einer Inkubation bei 37 °C für 2 h. Die Phagenproteine wurden anschließend für 10 min bei 21.380 x g bei 4 °C sedimentiert und final in 50 µL TM-Puffer resuspendiert.

### 4.10.2 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Quantifizierung von Proteinen erfolgte mittels Roti®-Nanoquant (Roth K880.1). Hierzu wurden 5 µL der entsprechenden Probe in 195 µL H<sub>2</sub>O gegeben und mit 800 µL Roti®-Nanoquant-Gebrauchslösung (1:5 (v/v) in H<sub>2</sub>O) gemischt. Anschließend wurde photometrisch der Quotient aus OD<sub>590</sub>/OD<sub>450</sub> bestimmt und die Proteinkonzentration der Probe anhand einer BSA-Eichreihe bestimmt.

### 4.10.3 SDS-Gelelektrophorese und Proteinvisualisierung

Für die SDS-Gelelektrophorese wurden 50 µL einer Proteinprobe mit 17 µL 4 x SDS-Ladepuffer (Tabelle 20) versetzt und 5 min bei 100 °C aufgeköcht. Anschließend wurde die Probe für 1 h bei einer Feldspannung 200 V und einer Stromstärke von 30 mA/Gel in einem 12% (v/v) Acrylamidtrenngel, mit vorgeschaltetem Sammelgel, 6% (v/v) Acrylamidsammelgel, in 1 x SDS-Puffer aufgetrennt.

Die Visualisierung der Proteine erfolgte über Nacht in Coomassie Silver Blue Färbelösung (Tabelle 21) mit anschließender Entfärbung in H<sub>2</sub>O.

Zur sensitiveren Visualisierung wurde eine Silberfärbung (Tabelle 22) durchgeführt. Hierzu wurde das SDS-Gel zunächst in 50 mL Fixierlösung für 1 h fixiert und anschließend zwei Mal in 50% (v/v) EtOH gewaschen. Die Sensitivierung des Gels erfolgte für 1 min in 127 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>(aq). Nach zweimaligem Waschen für 20 s in H<sub>2</sub>O erfolgte die Inkubation für 20 min in Färbelösung, gefolgt von zwei weiteren Waschschritten für je 20 s in H<sub>2</sub>O. Im folgenden Schritt wurde das SDS-Gel in 50 mL Entwicklerlösung für 4-5 min entwickelt bis die Entwicklung mit 1% (w/v) Glycerin(aq) für 30 min gestoppt wurde. Abschließend wurde das gefärbte Gel für 2 h in H<sub>2</sub>O gewaschen und in Einmachfolie eingeschweißt.

**Tabelle 20: Zusammensetzung der Komponenten für die SDS-PAGE.**

<b>SDS-Gele, Lade- und Laufpuffer:</b>		
<b>Sammelgel (6% (v/v) Acrylamid):</b>		
500,0 µL	30% (v/v) Acrylamid(aq)	Sigma-Aldrich
625,0 µL	0,5 M Tris-HCl(aq), pH 6,8	Roth
1375,0 µL	MilliQ	
2,5 µL	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth
25,0 µL	10% (v/v) Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck
<b>Trenngel (12% (v/v) Acrylamid):</b>		
2000,0 µL	30% (v/v) Acrylamid(aq)	Sigma-Aldrich
1250,0 µL	1,5 M Tris-HCl(aq), pH 8,8	Roth
1750,0 µL	MilliQ	
5,0 µL	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth
50,0 µL	10% (v/v) Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck
<b>4 x SDS-Ladepuffer:</b>		
300 mM	Tris-HCl(aq), pH 6,8	Roth
30,0% (v/v)	Glycerin	Roth
10,0% (v/v)	β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
10,0% (w/v)	Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
0,2% (w/v)	Bromphenolblau	Roth
<b>SDS-Laufpuffer:</b>		
25 mM	Tris-HCl	Roth
192 mM	Glycin	Roth
0,1% (w/v)	Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
	auf pH 8,3 einstellen	

**Tabelle 21: Zusammensetzung der Coomassie Silver-Blue Färbelösung.**

<b>Coomassie Silver-Blue Färbelösung:</b>		
100,0 mL	MilliQ	
100,0 mL	o-Phosphorsäure	Roth
100,0 g	Ammoniumsulfat	Roth
1,2 g	Coomassie Brilliant Blue G 250	Bio-Rad
	ad 800 mL mit MilliQ auffüllen	
20,0% (v/v)	MeOH oder EtOH vor der Verwendung zugeben	VWR

**Tabelle 22: Zusammensetzung der Lösung für die SDS-Silberfärbung.**

<b>Lösungen der SDS-Silberfärbung:</b>		
<b>Fixierlösung:</b>		
025,0 mL	EtOH	VWR
006,0 mL	CH <sub>3</sub> COOH	VWR
250,0 µL	37% (v/v) Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich
	ad 50 mL mit MilliQ auffüllen	

---

**Färbelösung:**

000,1 g	AgNO <sub>3</sub>	Roth
750,0 µL	37% (v/v) Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich
	ad 50 mL mit MilliQ auffüllen	

**Entwicklerlösung:**

001,5 g	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Roth
001,0 mL	127 mM Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (aq)	Merck
500,0 µL	37% (v/v) Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich
	ad 50 mL mit MilliQ auffüllen	

---

#### 4.10.4 Isolation von Sekundärmetaboliten aus *P. larvae*

Zur Isolation von Sekundärmetaboliten wurden 500 mL BHI-Medium mit 250 µL einer Zellsuspension von *P. larvae* aus einer Vorkultur mit OD<sub>600</sub>=15 (4.6.1) angeimpft und für 65 h bei 37 °C und 200 rpm kultiviert. Der gesamte Kulturansatz wurde in einen Scheidetrichter gegeben und mit 300 mL EtAc für 15 min durch Schütteln extrahiert. Die Phasentrennung erfolgte üN. Die organische Phase wurde in einen Rundkolben überführt und die wässrige Phase erneut mit 300 mL EtAc extrahiert. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Rotationsverdampfer bei 45 °C, 90 rpm und 300 mbar abgezogen. Die Rohextrakte wurden 1:1 (v/v) MeOH/Aceton gelöst und zum Einwiegen in 4 mL Gewindeflaschen (Braunglas) überführt. Die getrockneten Rohextrakte wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

#### 4.10.5 Dünnschichtchromatographie von Rohextrakten aus *P. larvae*

Für die Dünnschichtchromatographie (DC) wurden 10 µL der Rohextrakte (s. 4.10.4) ( $c_{\text{Extrakt}}=40$  mg/mL), bzw. 10 µL der Fraktionen (s. 4.10.6) mit einer Glaskapillare ( $d=0,2$  mm) auf eine DC Silicagel-Karte (Merck) aufgetropft. Dabei wurde die DC-Karte auf einer Heizplatte bei 60 °C gelagert, sodass das Lösungsmittel verdunsten konnte. Die Auftrennung der Extrakte, bzw. Fraktionen erfolgte bei RT in einer DC-Kammer in 4% (v/v) MeOH in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> oder in 10% (v/v) MeOH in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Die Laufrichtung wurde nach der Auftrennung mittels Bleistift auf der DC-Karte zur Bestimmung des Retentionsfaktors ( $R_f$ -Wert) markiert. Die Bestimmung der  $R_f$ -Werte erfolgte mit Formel 4.

**Formel 4: Bestimmung des Retentionsfaktors einer Rohextrakt-Komponente.**  $R_f$ , Retentionsfaktor;  $S_{\text{Komponente}}$ , Wanderungsstrecke der Komponente durch Visualisierung festgestellt;  $S_{\text{Laufmittel}}$ , Wanderungsstrecke Laufmittel.

$$R_f(\text{Komponente}) = \frac{S_{\text{Komponente}}}{S_{\text{Laufmittel}}}$$

Die Visualisierung der aufgetrennten Komponenten erfolgte nach Trocknen der DC-Karte unter dem Abzug bei UV-Licht mit einer Wellenlänge von  $\lambda=254$  nm und  $\lambda=366$  nm.

Ergänzend hierzu konnten nicht-fluoreszierende Substanzen durch Schwefelsäureverkohlung visualisiert werden. Hierzu wurden die DC-Karten mit 5% (v/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in EtOH besprüht, für 15 min unter dem Abzug getrocknet und anschließend im Wärmeschrank bei 110 °C verkohlt. Dadurch werden (nicht-fluoreszierende) Komponenten als dunkel gefärbter Punkt auf der DC-Karte erkennbar.

#### 4.10.6 Säulenchromatographie und Fraktionierung von Rohextrakten aus *P. larvae*

Zur Fraktionierung der Rohextrakte wurde eine Säulenchromatographie (SC) durchgeführt. Hierzu wurde eine Säule mit  $d=7$  mm und einer Länge von 30 cm verwendet. Die Säule wurde zunächst mit

einem Wattestopfen und einer Spatelspitze Quarzsand gepackt. Danach wurden 1,5 g FLASH-Kieselgel ( $d=0,04-0,063$  mm) in 10% (v/v) MeOH in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  aufgeschwemmt und auf die Säule gegeben. Das Lösungsmittel wurde langsam bis kurz oberhalb des Kieselgels abgelassen, der zu fraktionierende Rohextrakt auf die Säule gegeben und abschließend mit einer Spatelspitze Sand bedeckt.

Anschließend konnten die Komponenten entsprechend ihres spezifischen  $R_F$ -Wertes in 4% (v/v) MeOH in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  fraktioniert und eluiert werden.

Die Analyse der Fraktionen mittels DC erfolgte analog zu 4.10.5.

#### 4.10.7 *In vitro*-Nachweis nicht-ribosomaler produzierter Peptide

Das *Paenibacillus larvae*-Genom kodiert für mehrere NRPS/PKS-Cluster. In dieser Arbeit wurde die *in vitro* Produktion der Iturine Paenilarvin A-C untersucht. Hierzu wurden die Genotypen von *P. larvae* von einer Vorkultur auf CSA in 100 mL mH-Medium (Tabelle 23) angesetzt, mit 2% (v/v) XAD versetzt und bei 200 rpm und 30 °C für 6 d inkubiert. Danach wurde die Kultur über ein Probesieb gegeben (W: 200  $\mu\text{m}$ ) gegeben und das XAD in 50 mL Aceton für 2 h geschwenkt. Der Überstand wurde in einen Rundkolben gegeben und bei 45 °C und 90 rpm einrotiert. Der Rohextrakt wurde in 500  $\mu\text{L}$  MeOH aufgenommen, in 2 mL-Gewindeflaschen gegeben und zur weiteren Analyse an Dr. Kathrin I. Mohr (HZI) gegeben.

**Tabelle 23: Zusammensetzung des mH-Mediums.**

<b>mH-Medium:</b>		
2,0 g	Fleischextrakt	Merck
17,5 g	Casein Pepton	Roth
1,5 g	Stärke	Roth
15,0 g	Hefeextrakt	Oxiod BD
2,0 g	Glukose	Sigma-Aldrich
3,0 g	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Roth
1,0 g	NaPyruvat	Roth
pH 7,4 mit 3 M NaOH einstellen		
ad 1 L MilliQ und autoklavieren		
nach Autoklavieren 1 $\mu\text{g/mL}$ Vitaminset nach		
Schlegel zugeben		

#### 4.10.8 *In vivo*-Nachweis nicht-ribosomal produzierter Peptide

Zur Detektion der nicht-ribosomal produzierten Peptide aus, mit *P. larvae*-infizierten Bienenlarven, wurden 70 Larven im Alter von 7 d (entspricht  $d_4$  im Larvenassay, s. 4.11.3) in eine 2 mL-Gewindeflasche überführt und in 1 mL MeOH oder EtOH für 10 min mit Hilfe von Glaskugeln homogenisiert. Anschließend wurde die Suspension über Filterpapier gefiltert und die Flaschen mit 400  $\mu\text{L}$  des Lösungsmittels nachgespült. Die Extrakte wurden bei 60 °C und 90 rpm im Rotationsverdampfer getrocknet und zur weiteren Analyse an Dr. Kathrin I. Mohr (HZI, Braunschweig) gegeben.

### 4.11 Infektionsbiologische Methoden

#### 4.11.1 Vorbereitung der Bienenvölker für den *in vivo*-Larvenassay

Für den *in vivo*-Larvenassay wurden L1-Larven von *A. mellifera* benötigt. Hierzu wurden die Donorvölker als Wirtschaftsvölker in Segeberger Beuten mit zwei Bruträumen und zwei Honigräumen



mit jeweils 11 Waben Normalmaß geführt. Honig- und Brutraum wurden durch ein Absperrgitter voneinander getrennt. Die Wirtschaftsköniginnen stammten aus dem vorangegangenen Jahr. Die Vorbereitung der Völker erfolgte wie beschrieben (Lüken *et al.*, 2012). An d<sub>4</sub> wurde eine leere, bereits bebrütete Wabe in den Honigraum gehängt, um von den Arbeiterinnen belaufen und vorbereitet zu werden. Am Folgetag (d<sub>3</sub>) erfolgte die Schwarmkontrolle, in deren Rahmen die Königin mit einer Bannwabe auf die vorbereitete Wabe mit einer Bannwabe gekäfigt wurde. Diese Bannwabe wurde für 24 h in die Mitte des oberen Brutraumes gehängt. An d<sub>2</sub> wurde die Königin in den Brutraum entlassen, die bestiftete Wabe aus der Bannwabe entnommen und in den unteren Honigraum gehängt. Links und rechts neben die bestiftete Wabe wurde jeweils eine gedeckelte Brutwabe aus dem Brutbereich mit ansitzenden Bienen (ohne Königin!) gehängt. An d<sub>1</sub> beinhaltete die Wabe L1-Larven in einem maximalen Alter von 24 h. Diese Larven wurden für die *in vivo*-Larvenversuche verwendet.

#### 4.11.2 *In vivo*-Larvenassay

Die Untersuchungen zur unterschiedlichen Virulenz der Genotypen ERIC I-V von *P. larvae*, sowie die Therapieversuche erfolgten in *A. mellifera*. Hierzu wurde zunächst eine Multiwellplatte mit 48 Reaktionsräumen für den Larvenassay vorbereitet. Dafür wurde jeder Reaktionsraum mit einem Stück Watte (1/6 Zahnwatterolle) ausgelegt und die Watte mit 500 µL 15% (v/v) Glycerin(aq) getränkt. Auf die Watte wurde im Folgenden ein Nicot-Weiselbecher zur Aufnahme der Larve gesetzt und mit einer Pinzette leicht an die Watte angedrückt.

Danach wurden die Weiselbecher mit 20 µL Diet A (Tabelle 24) bestückt und eine L1-Larve aus der vorbereiteten Wabe (4.11.1) auf der Oberfläche der Futterlösung abgesetzt (d<sub>1</sub>). An d<sub>3</sub> wurden die Larven mit Diet B gefüttert, hierzu wurde die Futterlösung mit einer Pipettenspitze vorsichtig in die verbliebene Futtermenge unter die Larve gespritzt, sodass diese weiterhin oben auf der Futterlösung aufschwamm. Die Fütterung der Larven erfolgte weiterhin an den Tagen d<sub>4-6</sub> mit 30 µL, 40 µL und 50 µL Diet C.

**Tabelle 24: Zusammensetzungen der Futterlösungen für den *in vivo*-Larvenassay.**

<b>Futterlösungen für den <i>in vivo</i>-Larvenassay:</b>		
<b>Diet A:</b>		
2% (w/w)	Hefeextrakt (Bacto™)	Oxoid BD
12% (w/w)	Glukose	Roth
12% (w/w)	Fruktose	Roth
24% (w/w)	MilliQ	
	Suspension sterilfiltrieren und mit dem Gelee Royal mischen	
50% (w/w)	Gelee Royal	Imkereitechnik Möller
<b>Diet B:</b>		
3% (w/w)	Hefeextrakt (Bacto™)	Oxoid BD
15% (w/w)	Glukose	Roth
15% (w/w)	Fruktose	Roth
17% (w/w)	MilliQ	
	Suspension sterilfiltrieren und mit dem Gelee Royal mischen	
50% (w/w)	Gelee Royal	Imkereitechnik Möller
<b>Diet C:</b>		
4% (w/w)	Hefeextrakt (Bacto™)	Oxoid BD
18% (w/w)	Glukose	Roth
18% (w/w)	Fruktose	Roth
20% (w/w)	MilliQ	
	Suspension sterilfiltrieren und mit dem Gelee Royal mischen	
50% (w/w)	Gelee Royal	Imkereitechnik Möller

#### 4.11.2.1 Toxizitätstest von Peptiden auf *A. mellifera*-Larven

Um die Toxizität verschiedener Peptide aus *Bacillus aneurinolyticus* auf die Larvalentwicklung von *A. mellifera* zu testen wurden Versuche gemäß der international anerkannten Richtlinie hierzu durchgeführt (OECD/OCDE TG 237, 2012). Bei den verwendeten Peptiden handelte es sich um Tyrocidine (Trcs), die aus einer Kooperation der Abteilung für Biochemie der Universität Stellenbosch (Südafrika) stammten.

Der Test wurde an d<sub>4</sub> mit drei biologischen Replikaten á drei technischen Replikaten zu je 12 Larven durchgeführt. Die Kontrollgruppe erhielt Futterlösungen ohne Zusätze. Die Lösungsmittelkontrolle erhielt an d<sub>4</sub> 33 µL Diet C mit einem Anteil von 0,76% (v/v) N,N-Dimethylformamid(aq) (Sigma-Aldrich). Die Toxizität wurde in den Dosen 16,5 µg/Larve, 5,5 µg/Larve, 1,83 µg/Larve, 0,61 µg/Larve und 0,2 µg/Larve getestet. Hierzu erhielten die entsprechenden Testgruppen an d<sub>4</sub> 33 µL Diet C mit den zugehörigen Massen der Tyrocidine und einer finalen Konzentration von 0,76% (v/v) N,N-Dimethylformamid(aq). Gruppenübergreifend enthielten Diet A und B sowie Diet C an d<sub>5</sub> und d<sub>6</sub> keine Zusätze. Die Larven wurden von d<sub>5</sub> bis zum Ende des Larvalstadiums an d<sub>7</sub> auf ihre Vitalität hin überprüft. Bei ausbleibender Bewegung und Atmung selbst nach einem mechanischen Reiz wurden die Larven als tot klassifiziert und aus der Multiwellplatte entfernt.

#### 4.11.3 In vivo-Infektionen von *A. mellifera*

Für die infektionsbiologischen Studien an *A. mellifera* wurden L1-Larven in einem Alter von maximal 30 h an d<sub>1</sub> mit der infektiösen Form verschiedener Insektenpathogene infiziert. Bis einschließlich d<sub>15</sub> wurden die Individuen täglich auf ihre Vitalität überprüft. Sobald selbst nach einem mechanischen Reiz keine Reaktion mehr zu beobachten war, wurden die entsprechenden Tiere aus der Multiwellplatte entfernt und als tot klassifiziert. Zum Nachweis der Infektion mit *P. larvae* wurden die toten Individuen nach dem Entfernen aus der Multiwellplatte auf CSA ausplattiert und für 2 d bei 37 °C und 5% (v/v) CO<sub>2</sub> inkubiert. Die angezogenen Bakterien wurden anschließend mittels 16S rRNA-PCR (Govan *et al.*, 1999) auf *P. larvae* hin überprüft. Sofern diese PCR das entsprechende Amplifikat lieferte, wurde die Infektion mit *P. larvae* als letal interpretiert.

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm „R“ (Version „R i386 3.3.1) unter Verwendung des Student *t*-Test. Die hierzu benötigte Varianzhomogenität wurde vorab im gleichen Programm mit dem F-Test untersucht.

Zu jedem Infektionsansatz wurde parallel eine Kontrolle mitgeführt, deren Individuen sämtliche Futterlösungen ohne den Zusatz der Pathogene erhielten.

Bei den Infektionsversuchen betrug die Individuenzahl (n) an d<sub>1</sub> je Ansatz 48 Larven in drei biologischen Replikaten.

#### 4.11.4 In vivo-Phagentherapie

Im Rahmen der Phagentherapie werden L1-Larven von *A. mellifera* mit *P. larvae* infiziert (4.11.3) und zeitgleich mit *P. larvae*-spezifischen Bakteriophagen gefüttert (therapiert). Die Versuche wurden in drei biologischen Replikaten á 48 Larven durchgeführt. Eine Observation der Individuen erfolgte bis einschließlich d<sub>15</sub>. Neben der Kontrolle zur natürlichen Larvenmortalität wurden zusätzlich Kontrollen zum Einfluss der Phagen auf gesunde Individuen von *A. mellifera* mitgeführt. Dazu wurden den Larven, ohne dass diese zuvor mit *P. larvae* infiziert wurden, Bakteriophagen verabreicht. Tote Individuen wurden ebenfalls mittels PCR auf eine Infektion mit *P. larvae* überprüft (s. 4.11.3).

#### **4.11.4.1 Singuläre Phagenapplikation**

Die singuläre Phagenapplikation orientierte sich im Wesentlichen an der Infektion von *A. mellifera* mit *P. larvae*. Neben den 500 Sporen des entsprechenden *P. larvae*-Genotypen wurde an d<sub>1</sub> Diet A mit 50.000 pfu des verwendeten Bakteriophagen versetzt; das entspricht einer MOI (Multiplicity of Infection) von 100. Der Weitere Larvenassay verlief analog zu 4.11.3.

#### **4.11.4.2 Kontinuierliche Phagenapplikation**

Bei der kontinuierlichen Phagentherapie wurden sämtliche Futterlösungen mit einer Konzentration von 2.500 pfu/μL des entsprechenden Bakteriophagen versetzt. Die Durchführung dieser *in vivo*-Versuche verlief analog zu 4.11.4.1.

#### **4.11.4.3 Therapie von *P. larvae*-infizierter Bienenbrut mit Tyrocidinen**

Um die Trcs auf eine therapeutische Wirkung nach oraler Verabreichung an *P. larvae*-infizierte Bienenbrut zu testen, wurden zunächst drei biologische Replikate á 36 Larven mit *P. larvae* infiziert (4.11.3). An d<sub>4</sub> wurde den Therapieansätzen die Trcs als potentiell Therapeutikum in 33 μL Diet C mit einer finalen Konzentration 0,76% (v/v) N,N-Dimethylformamid(aq) verabreicht. Der Trc-Extrakt (T<sub>E</sub>) wurde in einer Dosis von 1,83 μg/Larve verabreicht, wohingegen der Trc-Rohextrakt (T<sub>Mix</sub>) in einer Dosis von 0,2 μg/Larve getestet wurde. Als Kontrolle wurden uninfizierte Larven, sowie infizierte Larven mitgeführt. Die Fütterung der Kontrollen erfolgte analog zum Infektionsversuch (4.11.3). Die Überprüfung der Mortalität erfolgte täglich bis einschließlich d<sub>15</sub>.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Isolation und Charakterisierung von *P. larvae*

Für die Isolation und Charakterisierung wurde *P. larvae* aus einer Vielzahl von (Import-) Honigen, Futterkranzproben und weiteren Erzeugnissen infizierter Völker isoliert. Hierzu wurden die Sporen auf Nährmedien zur Keimung gebracht und die *P. larvae*-typischen Kolonien mittels spezifischer 16S rRNA-PCR als *P. larvae* identifiziert.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten 200 verschiedene Isolate von *P. larvae* gewonnen werden. In einem Ringversuch zur Abundanz verschiedener Genotypen von *P. larvae* (5.1.1) wurden 53 Honigproben auf die Abundanz von *P. larvae* hin überprüft. Ein Nachweis konnte in 30 Proben erfolgen (Tabelle 25). Somit konnte *P. larvae* in 56,6% der Proben nachgewiesen werden.

*P. larvae* konnte in Honigproben von den vier Kontinenten Amerika (n=8, 3 Isolate, 37,5% positiv), Asien (n=8, 2 Isolate, 25% positiv), Australien (n=1, 1 Isolat, 100% positiv) und Europa (n=31, 21 Isolate, 67,7% positiv) nachgewiesen werden. Aus Honigmischungen aus EG- und Nicht-EG-Ländern (n=3) konnten drei Isolate gewonnen werden (100% positiv).

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass *P. larvae* aus einer Vielzahl kommerziell erhältlicher Honige isoliert werden konnte. In einer Stichprobe waren über 50% der Honige mit *P. larvae*-Sporen belastet.

#### 5.1.1 Abundanz verschiedener Genotypen von *P. larvae*

Zur Untersuchung der Abundanz der vier bekannten Genotypen von *P. larvae* (ERIC I-V) wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Kathrin I. Mohr (HZI, Braunschweig) Honigproben von vier verschiedenen Kontinenten und Honigmischungen aus EG- und Nicht-EG-Ländern analysiert.

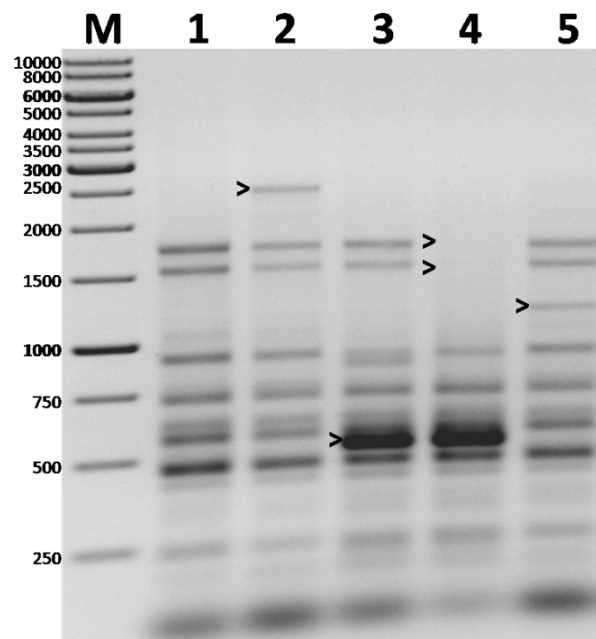
Aus 53 Honigproben konnten 30 *P. larvae*-Isolate gewonnen werden. Diese Isolate wurden mittels rep-PCR unter Verwendung von ERIC-Primern genotypisiert (Tabelle 25). Die erhaltenen Bandenmuster im Rahmen der ERIC-PCR wurden mit den Mustern der Referenzstämme der Genotypen ERIC I-IV verglichen. Daraus ergab sich, dass 20 Isolate (66,7%) dem Genotyp ERIC I zugeordnet werden konnten. Den Mustern von neun Isolaten (30%) konnte ERIC II zugeordnet werden. Das Bandenmuster des Isolates 138b entsprach weitestgehend dem Muster des Genotypen ERIC III, wies jedoch ein zusätzliches Amplifikat mit einer Größe von circa 1.250 bp auf (Abbildung 3). Somit konnte ein neuer Genotyp (ERIC V) isoliert werden.

**Tabelle 25: Zusammenfassung der *P. larvae*-positiven Honigproben der Untersuchungen zur Abundanz der verschiedenen Genotypen (ERICs).**

Honigprobe Lfd.-Nr.	Herkunft lt. Etikett	<i>P. larvae</i> (16S rRNA), Lfd.-Nr.	Genotyp (rep-PCR) ERIC
2	Südamerika	+, Isolat 134	II
3	EG- und Nicht-EG-Länder	+, Isolat 135	II
4	Frankreich	+, Isolat 136	I
5	Ungarn/Rumänien	+, Isolat 137	II
9	Spanien	+, Isolat 138b	V
10	Spanien	+, Isolat 139	I
11	EG- und Nicht-EG-Länder	+, Isolat 140b	I
12	Frankreich	+, Isolat 141	I
13	China	+, Isolat 142	I

17	Italien	+, Isolat 143b	I
18	Ukraine	+, Isolat 144b	II
20	Deutschland	+, Isolat 145	I
25	Neuseeland	+, Isolat 146b	I
25	Polen	+, Isolat 147b	I
27	Vereinigtes Königreich	+, Isolat 148	I
28	EG- und Nicht-EG-Länder	+, Isolat 149b	II
32	Frankreich	+, Isolat 153b	I
33	Italien	+, Isolat 150b	I
34	Italien	+, Isolat 151	II
35	Italien	+, Isolat 152	I
36	Italien	+, Isolat 154b	I
37	Italien	+, Isolat 155	I
39	Griechenland	+, Isolat 158	II
41	Schweiz	+, Isolat 159	I
42	Mexiko	+, Isolat 160	I
44	Ukraine	+, Isolat 161	II
46	Deutschland	+, Isolat 162	I
48	Israel	+, Isolat 173	II
51	Japan	+, Isolat 174	I
52	USA	+, Isolat 175	I

Bei der Betrachtung der Genotypen fiel auf, dass der Genotyp ERIC II lediglich in Europa und Amerika nachgewiesen werden konnte. Hinzu kommen die Proben aus den EG- und Nicht-EG-Ländern. Der Genotyp ERIC I wurde hingegen in Proben aller vier Kontinente mit positiven *P. larvae*-Nachweisen detektiert. Der neuartige Genotyp ERIC V konnte in einem europäischen Isolat (Herkunftsland Spanien) detektiert werden. Die Genotypen ERIC III und ERIC IV wurden innerhalb dieser Stichprobe nicht nachgewiesen.



**Abbildung 3: Fragmentmuster der Referenzstämme von *P. larvae* nach Amplifikation in der rep-PCR mit ERIC-Primern.** M, GeneRuler 1kb DNA Ladder; 1, *P. larvae* ERIC I (DSM 7030); 2, *P. larvae* ERIC II (DSM 25430); 3, *P. larvae* ERIC III (LMG 16252); 4, *P. larvae* ERIC IV (LMG 16247); 5, *P. larvae* ERIC V (DSM 106052); >, Hinweis auf abweichendes Fragment zum Muster des Genotypen ERIC I.

Es lässt sich festhalten, dass der Genotyp ERIC I in Proben von vier Kontinenten nachgewiesen werden konnte. ERIC II ließ sich lediglich in Europa und Amerika detektieren. Im Rahmen dieser Studie konnte zusätzlich der neuartige Genotyp ERIC V klassifiziert werden.

### **5.1.2 Charakterisierung der Genotypen von *P. larvae***

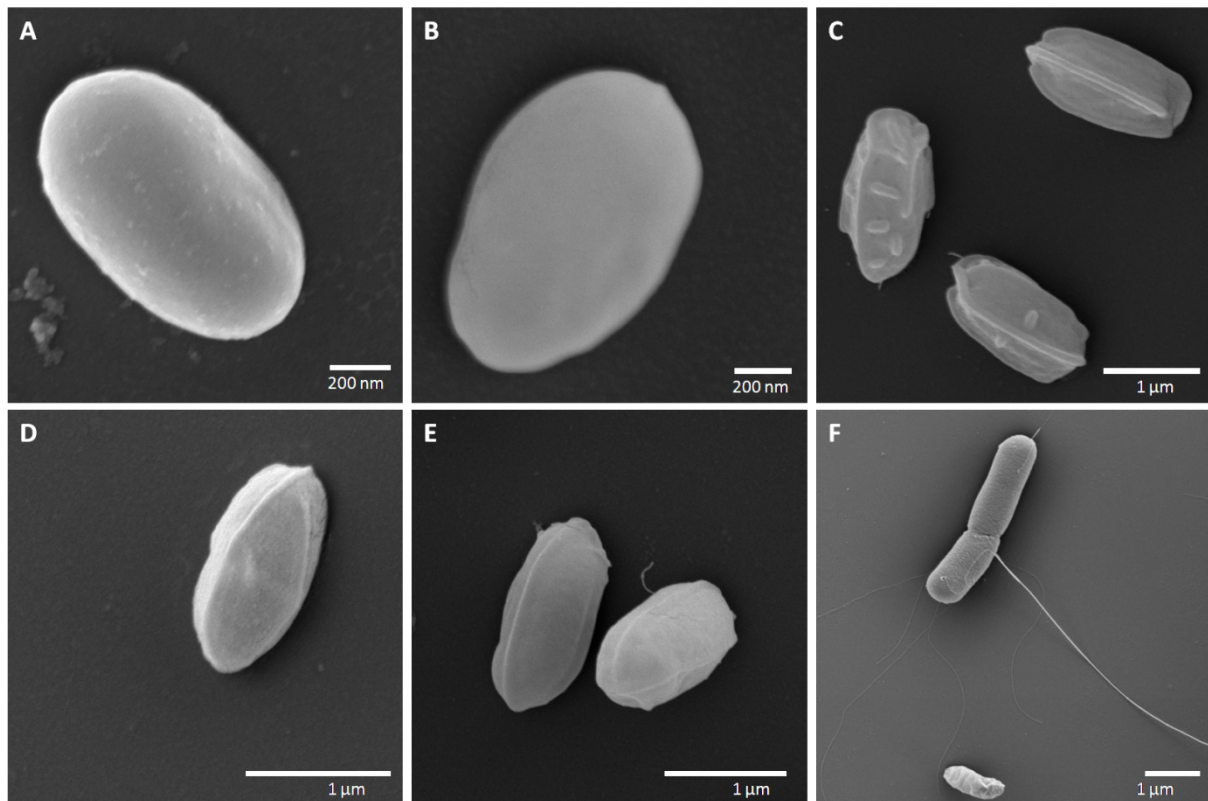
Die Ergebnisse der rep-PCR unter Verwendung von ERIC-Primer legten nahe, dass es sich bei dem Isolat 138b um einen neuen Genotyp von *P. larvae* handelt (ERIC V). Um dieses Indiz zu verifizieren wurden weitere Analysen des entsprechenden Isolates und der Referenzstämme der Genotypen ERIC I-IV durchgeführt.

#### **5.1.2.1 Morphologische Untersuchung der Genotypen von *P. larvae***

In vorangegangenen Studien konnten bereits Unterschiede in der Sporenmorphologie der unterschiedlichen Genotypen gezeigt werden (Genersch *et al.*, 2006). Analog dazu wurden die vegetativen Zellen und die Sporen der Referenzstämme von ERIC I-IV mit den Zellen und Sporen des neuen Genotypen ERIC V verglichen.

In Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Manfred Rohde (HZI, Braunschweig) wurden die Sporen und vegetativen Zellen der Genotypen ERIC I-V unter dem Rasterelektronenmikroskop hinsichtlich ihrer Morphologie untersucht.

Die vegetativen Zellen zeichneten sich durch eine Länge von circa 2 µm und eine Breite von etwa 1 µm aus. Die Zellen wiesen eine polytriche Begeißelung auf (s. Abbildung 4F). In den Präparaten ließen sich sowohl einzelne Zellen als auch Ketten von vegetativen *P. larvae*-Zellen erkennen. Morphologische Unterschiede zwischen den vegetativen Zellen konnten nicht beobachtet werden. Im Bereich der Sporenmorphologie ließen sich hingegen Unterschiede zwischen den jeweiligen ERICs feststellen. Die Sporen wiesen generell eine Länge von circa 1,0 µm und eine Breite von etwa 0,5 µm auf, wobei sich die Sporen in der Beschaffenheit ihrer Oberfläche unterschieden. Die Oberflächen der Sporen von ERIC I und ERIC II (ehem. *P. larvae* subsp. *larvae*) wiesen eine glatte Sporenoberfläche auf (Abbildung 11A+B). Bei den Genotypen ERIC III-V ließen sich hingegen Strukturen auf der Sporenoberfläche feststellen. Alle drei Genotypen wiesen Riefen auf, die längs über die Sporenoberfläche von einem Pol zum anderen verliefen (Abbildung 11C-E). Weiterhin konnten auf der Oberfläche der Sporen von ERIC III Strukturen zwischen den genannten Riefen festgestellt werden.



**Abbildung 4: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von *P. larvae*.** A, Spore ERIC I (DSM 7030); B, Spore ERIC II (DSM 25430); C, Spore ERIC III (LMG 16252); D, Spore ERIC IV (LMG 16247); E, Spore ERIC V (DSM 106052); F, vegetative Zelle ERIC IV (LMG 16247).

Anhand der Oberflächenstrukturen der Sporen ließen sich die fünf verschiedenen Genotypen von *P. larvae* in zwei Cluster einordnen. Hierbei wiesen die Genotypen ERIC I+II keine Längsriefen auf, die Genotypen ERIC III-V zeichneten sich durch Strukturen auf der Oberfläche aus. Dabei handelt es sich um Riefen (ERIC III-V) und vereinzelte Aufsätze zwischen den Riefen (ERIC III).

#### 5.1.2.2 Physiologische Untersuchung der Genotypen von *P. larvae*

Zur physiologischen Untersuchung der Genotypen wurden Auffälligkeiten während des Wachstums sowie Stoffwechselleistungen der Stämme betrachtet.

Im Rahmen der physiologischen Untersuchungen wurden die Genotypen ERIC I-V zunächst auf CSA angezogen. Hierbei zeigte sich, dass der Genotyp ERIC V bereits nach 3 d mit der Sporulation begann. Die Genotypen ERIC III und IV folgten nach etwa 7 d. Eine vollständige Sporulation der Genotypen ERIC I und II konnte nach 10 d ausgemacht werden.

Durch die Kultivierung bei 30 °C für 24 h auf CSA ließ sich bei ERIC I eine schwache  $\beta$ -hämolytische Aktivität dokumentieren, welche bei ERIC II ausblieb. Die Genotypen ERIC III-V zeichneten sich hingegen durch eine starke  $\beta$ -Hämolyse aus.

Zusammenfassend konnten 30 Isolate von *P. larvae* gewonnen werden, deren Genotyp festgestellt wurde. Ebenso erfolgte eine physiologische und morphologische Charakterisierung der Typstämme der Genotypen ERIC I-V von *P. larvae*.

### 5.1.2.3 Genomsequenzierung der Genotypen von *P. larvae*

Das Genom des Genotypen ERIC II wurde bereits in Gänze sequenziert, wohingegen vom Genotyp ERIC I nur Teilabschnitte sequenziert vorliegen (Djukic *et al.*, 2014b). Um die Genome vollständig miteinander zu vergleichen und Aussagen über die unterschiedlichen Virulenzen der Genotypen ERIC I-V von *P. larvae* treffen zu können, wurden die Genome der fünf Genotypen in Zusammenarbeit mit Dr. Boyke Bunk (DSMZ, Braunschweig) sequenziert (Beims *et al. submitted*).

### 5.1.2.4 NRPS/PKS-Cluster der Genotypen von *P. larvae*

Bakteriellen Sekundärmetaboliten kann häufig eine Funktion im Bereich der Virulenz zugewiesen werden. Aus diesem Grund wurden die Genome der Genotypen ERIC I-V über die Datenbank AntiSMASH (<https://antismash.secondarymetabolites.org/>) auf entsprechende biosynthetische Gencluster untersucht.

Im Genom von ERIC II konnten bereits vier NRPS/PKS-Cluster nachgewiesen werden (Djukic *et al.*, 2014b; Garcia-Gonzalez *et al.*, 2014a; Hertlein *et al.*, 2014; Müller *et al.*, 2014; Sood *et al.*, 2014). Die durchgeführten Analysen basierten auf diesen vier Genclustern (Tabelle 26).

Im Genom des Genotyp ERIC I konnten vier NRPS-Cluster nachgewiesen werden. Hierbei handelte es sich um die Biosynthesecluster für Bacillibactin (46% Ähnlichkeit), Paenilamicin (100% Ähnlichkeit), Paenilarvin (50% Ähnlichkeit) und Sevadacin (100% Ähnlichkeit).

ERIC II kodierte ebenfalls für diese Biosynthesecluster, jedoch mit anderen Ähnlichkeiten als ERIC I. Das entsprechende Bacillibactin-Cluster wies eine Ähnlichkeit von lediglich 38% auf, die übrigen drei Cluster (Sevadacin, Paenilarvin und Paenilamicin) jeweils 100%.

Die Genome der Genotypen ERIC III und ERIC IV kodierten lediglich für die Biosynthesecluster von Bacillibactin (jeweils 46% Ähnlichkeit) und Paenilamicin (ERIC III: 100% Ähnlichkeit; ERIC IV: 42% Ähnlichkeit).

Der neuartige Genotyp ERIC V kodierte wiederum für die vier oben genannten Biosynthesecluster. Dabei wiesen die Cluster für Paenilamicin, Paenilarvin und Sevadacin Ähnlichkeiten von 100% auf, Bacillibactin hingegen nur 46%.

**Tabelle 26: Ergebnisse zur Detektion von NRPS-Syntheseclustern in den Genomen der Genotypen ERIC I-V von *P. larvae*.**

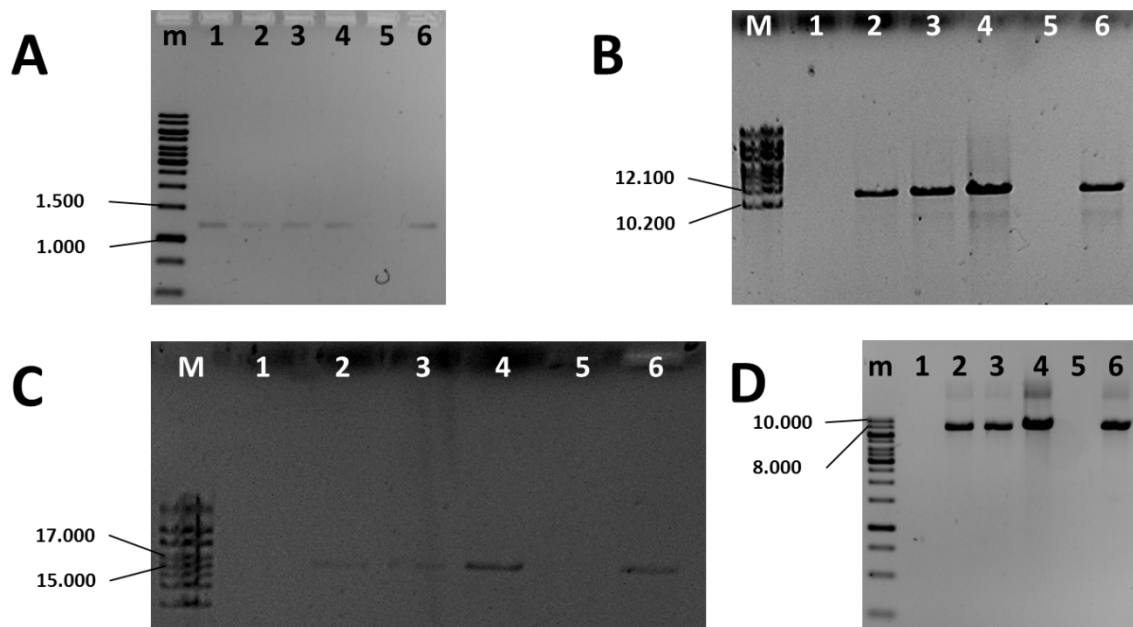
Genotyp (ERIC)	Zugehöriges Gencluster	Lokalisierung im Genom	Ähnlichkeit zum Vergleichscluster [%]
ERIC I DSM 7030	Bacillibactin	1.886.731 – 1.936.485	46
	Paenilamicin	2.099.885 – 2.213.835	100
	Paenilarvin	2.214.916 – 2.226.219	50
	Sevadacin	2.359.981 – 2.434.799	100
ERIC II DSM 25430	Bacillibactin	1.491.189 – 1.540.943	38
	Paenilamicin	1.709.923 – 1.823.881	100
	Paenilarvin	1.821.078 – 1.897.127	100
	Sevadacin	1.958.786 – 2.030.871	100
ERIC III LMG16252	Bacillibactin	1.787.298 – 1.837.051	46
	Paenilamicin	2.123.638 – 2.293.839	100
	Paenilarvin	-/-	-/-
	Sevadacin	-/-	-/-
ERIC IV	Bacillibactin	1.803.829 – 1.853.583	46



LMG 16247	Paenilamicin	2.140.104 – 2.210.229	42
	Paenilarvin	-/-	-/-
	Sevadacin	-/-	-/-
ERIC V	Bacillibactin	2.723.567 – 2.773.321	46
Isolat 138b	Paenilamicin	2.376.681 – 2.490.630	100
	Paenilarvin	2.298.343 – 2.374.392	100
	Sevadacin	2.111.823 – 2.185.500	100

Die Analyse der Genome auf NRPS/PKS-Cluster ergab, dass die verschiedenen Genotypen für vier verschiedene NRPS-Cluster kodieren können. Dabei wurden die Cluster für Bacillibactin und Paenilamicin mit unterschiedlichen Ähnlichkeiten in allen fünf Genotypen gefunden. Die Cluster für Sevadacin und Paenilarvin konnten hingegen nur in den Genotypen ERIC I, II und V nachgewiesen werden.

Zur Verifizierung der *in silico*-Ergebnisse aus der Genomanalyse wurden die ERICs I-V zusätzlich über die Amplifikation der Gene *ituA-D* hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Produktion von Paenilarvin überprüft (Abbildung 5).



**Abbildung 5: PCR-Produkte der Genotypen ERIC I-V von *P. larvae* zur Überprüfung auf Gene des Paenilarvin-Operons.** A, *ituD*; B, *ituA*; C, *ituB*; D, *ituC*. Probenaufrag: m, GeneRuler 1kb DNA Ladder; M, GeneRuler High Range DNA Ladder; 1, *P. larvae* ERIC I (DSM 7030); 2, *P. larvae* ERIC II (DSM 25430 via HZI); 3, *P. larvae* ERIC II (DSM 25430 via DSMZ); 4, *P. larvae* ERIC III (LMG 16252); 5, *P. larvae* ERIC IV (LMG 16247); 6, *P. larvae* ERIC V (DSM 106052).

Die Auswertung der Amplifikate entsprechender Polymerasekettenreaktionen ergab, dass ERIC IV über keines der entsprechenden Gene aus dem Paenilarvin-Operon verfügt. Das Gen *ituD*, welches für einen Vorläufer der Paenilarvine A-C kodiert konnte über das entsprechende Amplifikat in einer Größe von circa 1,2 kbp in den übrigen Genotypen von *P. larvae* nachgewiesen werden. *In silico* wurde die Befähigung der ERICs zur Produktion von Paenilarvin A-C aus dem entsprechenden Vorprodukt überprüft. Dazu wurden die Stämme auf die Gene *ituA-C*, die für die jeweiligen Paenilarvine kodieren, mittels PCR getestet. Die entsprechenden PCR-Produkte (*ituA*: 11,9 kbp; *ituB*: 16,1 kbp; *ituC*: 7,8 kbp) konnten in den Genotypen ERIC II und ERIC III-V nachgewiesen werden.

*In silico* konnten über die Sequenzierung der Gesamtgenome der fünf Genotypen und den Abgleich mittels *AntiSmash* NRPS-Cluster für Bacillibactin und Paenilamicin in allen Genotypen mit unterschiedlicher Homologie nachgewiesen werden. Die Cluster für Paenilarvin und Sevadacin konnten nur ERIC I, II und V mit unterschiedlichen Homologien nachgewiesen werden. Über die Amplifikation der entsprechenden Gene konnte jedoch auch in ERIC III das Paenilarvin-Cluster nachgewiesen werden.

In einem weiteren Versuch wurde die *in vitro*-Produktion der nicht-ribosomal produzierten Peptide in den verschiedenen Genotypen untersucht, um die Ergebnisse der *in silico*-Analyse zu bestätigen.

Für den *in vitro*-Nachweis wurde *P. larvae* in unterschiedlichen Medien kultiviert und die Extrakte aus den Kulturüberständen anschließend in Zusammenarbeit mit Dr. Kathrin I. Mohr (HZI, Braunschweig) analysiert. Aufgrund der fehlenden Referenzmassen in dem verwendeten Gerät konnten lediglich für die Paenilarvine belastbare Daten erhoben werden.

Hierbei konnten die Paenilarvine A und B bei den Genotypen ERIC II, III und V detektiert werden. In der Kultur des Genotyp ERIC V konnte darüber hinaus Paenilarvin C nachgewiesen werden. Als weiteres NRP konnte Sevadacin in der Kultur des Genotypen ERIC II detektiert werden.

Eine Referenzmasse für Sevadacin stand im Rahmen der Versuche nicht zur Verfügung, jedoch wiesen die Massenwerte eine starke Ähnlichkeit zu den Publizierten Daten des Sevadacin auf.

In der *in vitro*-Analyse zeigte sich, dass die Paenilarvin als nicht-ribosomal produziertes Peptid in den Genotypen ERIC II, III und V gebildet wird. Weiterhin liegt es aufgrund der Massenspektren nahe, dass ERIC II das NRP Sevadacin *in vitro* produziert.

Für die *in vivo*-Analyse der NRPS wurden L1-Larven unter Laborbedingungen mit den Genotypen ERIC I, ERIC II oder ERIC V von *P. larvae* infiziert. Die toten Larven wurden anschließend in organischen Lösungsmitteln homogenisiert und mittels HPLC/MS auf die Abundanz der nicht-ribosomal produzierten Peptide untersucht.

Die Ergebnisse der HPLC/MS-Analyse infizierter *A. mellifera*-Larven haben gezeigt, dass bei einer Infektion von *A. mellifera*-Larven mit ERIC II die NRPs Paenilarvin A-C, sowie Sevadacin detektiert werden konnten. Bei einer Infektion mit dem Genotyp ERIC V konnten lediglich die Paenilarvine A und C nachgewiesen werden.

Zur weiteren Verifizierung der *in vivo*-Ergebnisse unter Laborbedingungen wurden Larven, die durch eine Infektion mit *P. larvae* zu AFB-Schleim zersetzt wurden, nach dem oben genannten *in vivo*-Screening aufgearbeitet und analysiert. Hierzu wurden die Genotypen ERIC I und ERIC II herangezogen.

Durch die Analyse der resuspendierten Larvenlysate konnten in den Überresten der mit dem Genotypen ERIC II infizierten Bienenbrut die NRPs Paenilarvin A-C und Sevadacin detektiert werden. In einem Feldisolat aus AFB-Schleim konnten für ERIC I keine NRPs nachgewiesen werden.

In klinischen Feldisolaten konnten lediglich die Paenilarvine und Sevadacin als NRPs für den Genotyp ERIC II nachgewiesen werden.

*In silico* konnten vier verschiedene NRPS-Cluster in den unterschiedlichen Genotypen von *P. larvae* nachgewiesen werden, wobei die Cluster für Bacillibactin und Sevadacin in allen fünf ERICs mit unterschiedlicher Homologie zu finden sind. Die NRPS-Cluster für Sevadacin und Paenilarvin konnten

nur in ERIC II, III und V nachgewiesen werden. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass alle Genotypen, die über das entsprechende Paenilarvin-Cluster verfügen auch Paenilarvine produzieren. In ERIC II konnten zusätzlich Hinweise auf die *in vitro*-Produktion von Sevadecin gefunden werden. *In vivo* konnte in ERIC II und ERIC V die Produktion von Paenilarvinen nachgewiesen werden. Ferner zeigten sich bei Infektionen mit ERIC II deutliche Hinweise auf die *in vivo*-Produktion von Sevadecin. In ERIC I ließen sich *in vivo* keine NRP detektieren.

### 5.1.2.5 Paenilarvin als Virulenzfaktor

In den vorangegangenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die NRP von *P. larvae* im Rahmen der AFB-Infektion produziert wurden. Im speziellen Fall sollten die Paenilarvine auf ihre Rolle im Laufe einer Infektion mit *P. larvae* analysiert und als potentielle Virulenzgene charakterisiert werden.

In einem ersten Schritt wurden die Paenilarvine A und B in Kooperation mit Dr. Sakshi Sood (HZI, Braunschweig) hinsichtlich ihrer toxischen Wirkung auf Bienenbrut getestet. Hierzu wurden 2,5 µg, bzw. 5 µg der entsprechenden Peptide gemäß OECD 237 an d<sub>4</sub> an die Larven verabreicht und die Mortalität bis d<sub>15</sub> dokumentiert.

Für die Versuche zur Toxizitätsbestimmung der Paenilarvine wurden jeweils drei Replikate á 24 Larven verwendet. Die Kontrolle wurde durch zwei Replikate á 48 Larven repräsentiert. Als weitere Kontrolle wurden 48 Larven an d<sub>1</sub> mit 500 Sporen des paenilarvinbildenden *P. larvae*-Stammes DSM 25430 (ERIC II) infiziert (Abbildung 6).

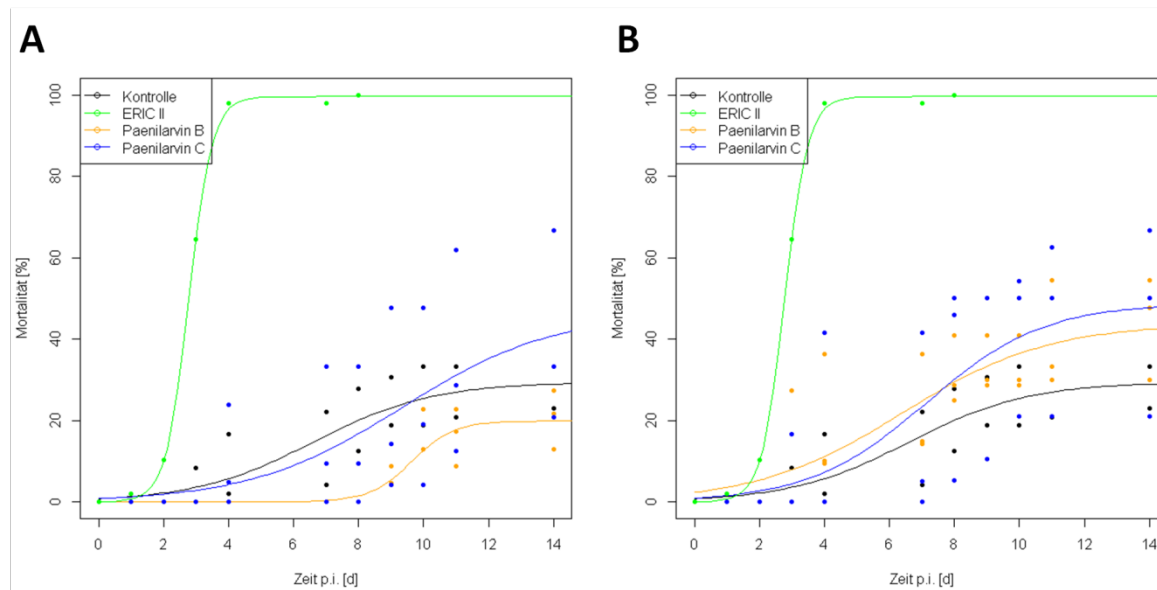
Die Mortalität der Kontrollpopulation wies nach 14 d einen Wert von 28,13% ± 5,21 auf. Die Kontrolle der infizierten Larven wies eine Mortalität von 100% auf. Durch die Fütterung von 2,5 µg Paenilarvin B resultierte nach 14 d eine Gesamtmortalität von 20,68% ± 4,14. Durch die Fütterung von 2,5 µg Paenilarvin C stieg die Mortalität bis d<sub>14</sub> auf einen Wert von 40,28% ± 13,68 an.

Durch die Fütterung von 5 µg Paenilarvin B an d<sub>4</sub> stieg die Mortalität der betroffenen Individuen bis d<sub>15</sub> auf 44,06% ± 7,31 an. Die Unterschiede für Paenilarvin C fallen mit 45,91% ± 13,33 ähnlich aus.

Im Rahmen dieser Versuche konnten keine signifikanten Unterschiede zur Kontrolle im Bereich der Mortalität nach 14 d festgestellt werden (Tabelle 27).

**Tabelle 27: Zusammenfassung der akuten Paenilarvin-Fütterung im *in vivo*-Larvenassay.**

NRPS	Kontrollmortalität 28,31% ± 5,21			
	c=2,5 µg/Larve		c=5,0 µg/Larve	
	Mortalität [%] ± SEM	p-value	Mortalität [%] ± SEM	p-value
Paenilarvin B	20,68 ± 4,14	0,3419	44,06 ± 7,31	0,5497
Paenilarvin C	40,28 ± 13,68	0,2163	45,91 ± 13,33	0,3876



**Abbildung 6: Mortalität der Brut von *A. mellifera* nach oraler Verabreichung von 2,5 µg (A), bzw. 5,0 µg (B) Paenilarvin an d<sub>4</sub> der Larvalentwicklung.** Die Verabreichung erfolgte an d<sub>4</sub> an uninfizierte Larven, die Kontrolle erhielt keine Futterzusätze. Als Referenz wurden Larven an d<sub>1</sub> (t = 0 d p.i.) mit 500 Sporen des Genotypen ERIC II (DSM 25430) infiziert.

Durch die orale Verabreichung der Paenilarvine B und C an *A. mellifera*-Larven ließen sich keine signifikanten Unterschiede bezogen auf die Mortalität feststellen.

Ergänzend sollte das Gen *ituD*, welches für einen Vorläufer der Paenilarvine kodiert, in den Genotypen ERIC II (DSM 25430) und ERIC V (DSM 106052) deletiert werden. Diese Mutante solle in weiteren Versuchen analysiert werden und im Rahmen von *in vivo*-Infektionen Aufschluss über die Funktion der Paenilarvine als Virulenzfaktoren im Rahmen der AFB-Pathogenese geben.

Zunächst sollte eine Kanamycinresistenzkassette mittels Joining-PCR amplifiziert werden. Da *P. larvae* jedoch eine hohe Toleranz gegenüber Kanamycin aufwies und das entsprechende Konstrukt nicht amplifiziert werden konnte, sollte im Weiteren die Erstellung des Knock-Out-Konstruktes modifiziert werden. Über Restriktion und Ligation wurde *ituD* durch eine Tetracyclinresistenz (*Tet*<sup>R</sup>) ersetzt. Über Elektroporation und Protoplastentransformation wurde das entsprechende Konstrukt in den Wildtyp eingebracht, um so die  $\Delta$ *ituD*-Mutante von *P. larvae* ERIC II (DSM 25430) und ERIC V (DSM 106052) zu erhalten.

Die *Tet*<sup>R</sup>-Kassette konnte erfolgreich *in vitro* erstellt und in *E. coli* transformiert werden. Eine Amplifikation und Aufreinigung der Kassette für die anschließende Transformation von *P. larvae* war erfolgreich. Die Selektion auf eine entsprechende  $\Delta$ *ituD*-Mutante von *P. larvae* lieferte bisher noch kein positives Ergebnis.

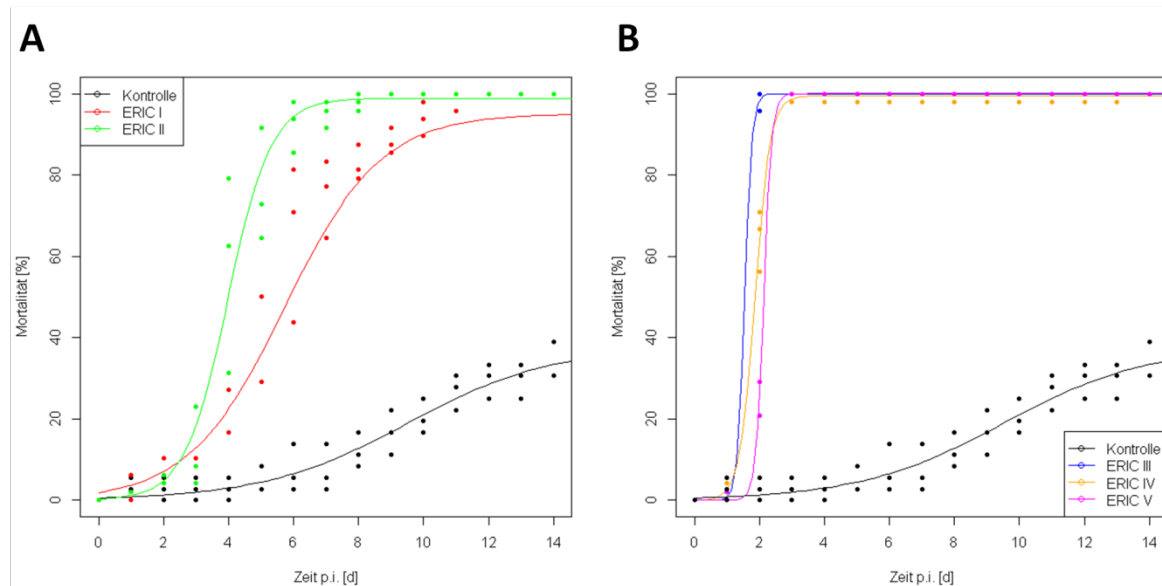
Ein Knock-Out-Konstrukt für den Vorläufer der Paenilarvine konnte erfolgreich erstellt werden. Die Erstellung der  $\Delta$ *ituD*-Mutante von *P. larvae* dauert derzeit noch an. Die entsprechenden Mutanten sollen im Rahmen ihrer Charakterisierung auf eine potentiell verminderte Virulenz gegenüber *A. mellifera*-Larven überprüft werden. Eine verminderte Virulenz würde einen weiteren Hinweis auf die Rolle der Paenilarvine als Virulenzfaktoren geben.

### 5.1.2.6 Virulenz der Genotypen von *P. larvae*

In mehreren umfangreichen Studien wurden Unterschiede zwischen den verschiedenen Genotypen von *P. larvae* aufgezeigt und publiziert (Genersch 2010). In den folgenden Versuchen sollte die Virulenz der ERICs I-V im Rahmen von *in vivo*-Infektionsversuchen mit L1-Larven untersucht werden.

Zur Analyse der Virulenz von *P. larvae* ERIC I-V wurden je ERIC drei Replikate á 48 Larven mit 500 Sporen je Larve an d<sub>1</sub> infiziert. Die Mortalität wurde täglich dokumentiert (Abbildung 7).

Die Ergebnisse dieser Versuche zeigten, dass sich die ERICs hinsichtlich ihrer Virulenz und der LT<sub>100</sub> unterschieden. ERIC I erreichte die LT<sub>100</sub> ~12 d nach der Infektion, ERIC II hingegen bereits nach ~7 d. Die Genotypen ERIC IV und V wiesen eine deutlich höhere Virulenz auf, sodass die LT<sub>100</sub> in beiden Fällen bereits nach 3 d erreicht wurde. Der Genotyp ERIC III stellte sich als der virulenteste Genotyp dar, sodass bereits 2 d nach der Infektion 100% der infizierten Larven verstarben. Die natürliche Mortalität der Kontrollgruppe in dieser Versuchsreihe lag bei 33,33% ± 2,78.



**Abbildung 7: Mortalität von *A. mellifera* nach Infektion mit *P. larvae* im L1-Stadium (500 Sporen/Larve).** A, häufig auftretende Genotypen (ERIC I und II); B, selten auftretende Genotypen (ERIC III-V).

Zusammenfassend können die Genotypen ERIC I-V von *P. larvae* hinsichtlich ihrer Virulenz in drei Gruppen gegliedert werden. Die seltenen Genotypen ERIC III-V wiesen eine hochgradige Virulenz mit einer LT<sub>100</sub> von ~3 d auf. Der am weitesten verbreitete Genotyp ERIC I erreichte seine LT<sub>100</sub> nach ~12 d und der virulentere Genotyp ERIC II nach ~7 d.

## 5.2 Trcs als potentiellies Therapeutikum der AFB und EFB

Bei Trcs handelt es sich um cyclische Dekapeptide, die von *B. aneurinolyticus* produziert werden. Die Gruppe um Johan Arnold Vosloo (Stellenbosch University, Südafrika) konnte bereits zeigen, dass die Stoffe eine biologische Aktivität gegenüber human- und phytopathogenen Pilzen aufweisen (Troskie *et al.*, 2014a). Ebenso konnte eine Aktivität gegenüber Gram-positiven Bakterien nachgewiesen werden (Leussa and Rautenbach, 2014; Spathelf and Rautenbach, 2009). Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine biologische Aktivität gegenüber *P. larvae*, *M. plutonius* und den kommensalen Erregern der EFB untersucht werden. Weiterhin wurde die Aktivität gegenüber Bienenlarven und –brut, sowie die Eignung der Trcs als potentiellies Therapeutikum gegen Infektionen mit *P. larvae* untersucht. Ferner wurden die Effekte der Trcs auf Vertreter des bakteriellen Mikrobioms der Honigbiene untersucht.

### 5.2.1 *In vitro*-Studien zur therapeutischen Wirkung der Trcs gegen bakteriell bedingte Brutkrankheiten von *A. mellifera*

Zur *in vitro*-Analyse der biologischen Aktivität der Trcs als potentiellen Therapeutikum gegen bakteriell bedingte Brutkrankheiten von *A. mellifera* wurde zunächst die minimale Hemmkonzentration (MHK) des bakteriellen Wachstums bestimmt. Zunächst wurden aufgereinigte Thyrothricine ( $T_E$ ) gegenüber den bakteriellen Bienenpathogenen *P. larvae* und *M. plutonius*, sowie den kommensalen Erregern der EFB *E. faecalis* und *P. alvei* getestet. Hierzu wurde die MHK in Multiwellplatten bei OD<sub>595</sub> ermittelt. Ebenso wurde die MHK gegenüber bakteriellen Vertretern des Mikrobioms von *A. mellifera* (Mohr and Tebbe, 2007, 2006) untersucht.

Die Analyse und Auswertung der Rohdaten fand in Kooperation mit der Stellenbosch University statt und wurde von Johan Arnold Vosloo durchgeführt.

*P. larvae* wies als Erreger der AFB eine hohe Sensitivität gegenüber  $T_E$  auf. Diese Sensitivität ist genotypübergreifend. Neben den vier Typstämmen der ERICs I-IV wurden zudem Feldisolate der Genotypen ERIC I und II getestet. Die MHK deckt in den Ergebnissen ein Intervall von < 0,781-7,29  $\mu\text{g/mL}$  ab, wobei die Isolate 25 und 145 (ERIC I), sowie Isolat 1 (ERIC II) eine höhere Toleranz gegenüber  $T_E$  aufwiesen (MHK > 20  $\mu\text{g/mL}$ ). Isolatübergreifend liegt die durchschnittliche MHK gegenüber  $T_E$  bei einem Wert von 7,3  $\mu\text{g/mL} \pm 1,51$ . Die MHK von *M. plutonius* wurde auf 12,5  $\mu\text{g/mL}$  bestimmt und lag somit höher als bei *P. larvae*. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die kommensalen Erreger der EFB eine Sensitivität gegenüber  $T_E$  aufwiesen. Bezieht man die MHK der kommensalen Erreger und von *M. plutonius* auf eine gemeinsame MHK der EFB bezogen auf  $T_E$  ergibt sich ein Wert von 8,2  $\mu\text{g/mL} \pm 1,60$ .

**Tabelle 28: Biologische Aktivität des Trcs  $T_E$  gegenüber bakteriellen Bienenpathogenen und den kommensalen Erregern der EFB.** MHK, minimale Hemmkonzentration; SEM, Standardfehler des Mittelwertes.

Bakterium	Stamm	MHK [ $\mu\text{g/mL}$ ] $\pm$ SEM
<i>P. larvae</i>	ERIC I, DSM 7030 (n=2)	6,25 $\pm$ 0,000
	ERIC I, Isolat 11 (n=3)	1,23 $\pm$ 0,170
	ERIC I, Isolat 15 (n=3)	< 0,781
	ERIC I, Isolat 24 (n=2)	< 0,781
	ERIC I, Isolat 25 (n=3)	29,20 $\pm$ 11,000
	ERIC I, Isolat 138 (n=3)	< 0,781
	ERIC I, Isolat 145 (n=3)	21,60 $\pm$ 1,700
	ERIC II, DSM 25430 (n=3)	2,73 $\pm$ 1,800
	ERIC II, Isolat 1 (n=3)	25,00 $\pm$ 0,000

	ERIC II, Isolat	3 (n=2)	3,13 ± 0,000
	ERIC II, Isolat	6 (n=3)	1,27 ± 0,410
	ERIC II, Isolat	7 (n=3)	3,13 ± 0,000
	ERIC II, Isolat	17 (n=3)	< 0,781
	ERIC III, LMG 16252	(n=3)	2,08 ± 0,520
	ERIC IV, LMG 16247	(n=3)	7,29 ± 2,800
<i>M. plutonius</i>	LMG 20360	(n=3)	12,50 ± 0,000
<i>P. alvei</i>	DSM	29 (n=2)	1,56 ± 0,000
<i>E. faecalis</i>	DSM 20376	(n=3)	8,33 ± 2,100

Die *in vitro*-Versuche mit bakteriellen Pathogenen der Honigbiene haben gezeigt, dass diese eine hohe Sensitivität gegenüber  $T_E$  aufwiesen (Tabelle 28). Bezogen auf die bakteriellen Pathogene lässt sich die durchschnittliche MHK aus den ermittelten Werten auf  $7,47 \mu\text{g/mL} \pm 1,29$  beziffern.

In einem weiteren Versuch konnte gezeigt werden, dass die Sensitivität der ausgewählten Vertreter des bakteriellen Mikrobioms von *A. mellifera* gegenüber  $T_E$  geringer ausfällt als die der Pathogene. Die MHK der Gram-positiven Mikrobiota lässt sich anhand der ermittelten Werte (Tabelle 29) auf durchschnittlich  $44,34 \mu\text{g/mL} \pm 17,69$  bestimmen und die der Gram-negativen Vertreter auf  $82,60 \mu\text{g/mL} \pm 9,91$ .

**Tabelle 29: Biologische Aktivität des Trcs  $T_E$  gegenüber Vertretern des bakteriellen Mikrobioms der Honigbiene.** MHK, minimale Hemmkonzentration.

Bakterium	Stamm	MHK [ $\mu\text{g/mL}$ ]
<i>B. megaterium</i>	LMG 7127	18,5
<i>B. pumilus</i>	LMG 3455	15,3
<i>B. subtilis</i>	LMG 2099	21,1
<i>B. borstelensis</i>	DSM 6347	> 100,0
<i>P. maritimus</i>	DSM 17275	15,9
<i>S. pasteurii</i>	DSM 30868	10,3
<i>S. griseus</i>	DSM 1471	10,8
<i>C. denitrificans</i>	LMG 21602	47,9
<i>D. acidovorans</i>	LMG 1226	> 100,0
<i>G. oxydans</i>	DSM 2003	> 100,0
<i>J. lividum</i>	LMG 2892	> 100,0
<i>P. africanus</i>	LMG 10345	76,6
<i>P. okeanokoites</i>	DSM 15489	> 100,0
<i>P. fluorescens</i>	DSM 6147	> 100,0
<i>R. picketti</i>	LMG 5342	> 100,0
<i>S. floricola</i>	LMG 23170	19,3
<i>S. enterica</i>	DSM 11320	> 100,0

Basierend auf den ermittelten durchschnittlichen MHK lagen diese für die getesteten Gram-positiven Mikrobiota um den Faktor 5,93 und für die Gram-negativen 11,06 Mal höher, als die der Bienenpathogene.

Bezogen auf die getesteten Mikrobiota lässt sich eine durchschnittliche MHK von  $60,9 \mu\text{g/mL} \pm 9,95$  errechnen, die somit um den Faktor 8,15 höher liegt als die der Pathogene. Im Rahmen der *in vitro*-Versuche der Trc-Verabreichung konnte somit gezeigt werden, dass diese eine biologische Aktivität gegenüber Bienenpathogenen und deren Mikrobiom aufwiesen, wobei die Bienenpathogene wesentlich sensibler auf  $T_E$  reagierten.

## 5.2.2 *In vivo*-Studien an Bienenbrut zur Wirksamkeit der Trcs gegen *A. mellifera*

Im Rahmen dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass T<sub>E</sub> eine biologische Aktivität gegenüber ausgewählten Vertretern des Mikrobioms von *A. mellifera* aufweist. Ebenso zeigten die bakteriellen Pathogene der Honigbiene eine stärkere Sensitivität gegenüber dem verwendeten Extrakt. Da der AFB-Erreger eine höhere Sensitivität gegenüber T<sub>E</sub> aufwies als die Vertreter des Mikrobioms wurde in einem ersten *in vivo*-Versuch die Larvenverträglichkeit der Trcs T<sub>Mix</sub> und T<sub>E</sub> getestet.

Gemäß des Toxizitätstest an Larven der Honigbiene (OECD/OCDE TG 237, 2012) wurden drei unterschiedliche Konzentrationen der Trcs, das Lösungsmittel, eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt.

Die Testreihen zur Untersuchung der Toxizität der Trcs wurden parallel durchgeführt, sodass sich die Ergebnisse des T<sub>E</sub> und des T<sub>Mix</sub> auf dieselbe Kontrolle und Lösungsmittelkontrolle beziehen. Die Signifikanzüberprüfung erfolgte jeweils zur Kontrolle des entsprechenden Tages mittels Student *t*-Test.

Die Ergebnisse zeigten zunächst, dass der Test in seiner Ausführung den Normen der OECD/OCDE entspricht. Die Mortalität der Kontrollgruppe lag mit 6,40% ± 1,85 unterhalb der geforderten Maximalmortalität von 15%. Weiterhin ließ sich kein signifikanter Einfluss des Lösungsmittels DMF auf die Larvenmortalität beobachten (Mortalität: 8,33% ± 3,67). Die Positivkontrolle der Dimethoatfütterung wies an d<sub>7</sub> eine Mortalität von 87,96% ± 4,63 auf, die somit auch oberhalb der geforderten 50% lag. Die Ergebnisse der Signifikanzüberprüfung für die Rahmenbedingungen sind in Tabelle 30 dargestellt.

**Tabelle 30: Kontrollmortalität der *A. mellifera*-Larven zur Methodenvalidierung der akuten Giftfütterung (OECD/OCDE TG 237, 2012).** SEM, Standardfehler des Mittelwertes.

Gruppe		Mortalität [%] ± SEM	Signifikanz zur Kontrolle	
Kontrolle	d <sub>5</sub>	0,00% ± 0,00		
	d <sub>6</sub>	3,39% ± 1,61		
	d <sub>7</sub>	6,50% ± 1,85		
DMF	d <sub>5</sub>	1,85% ± 1,22	p = 0,169	[n.S.]
	d <sub>6</sub>	6,48% ± 3,04	p = 0,453	[n.S.]
	d <sub>7</sub>	6,48% ± 3,68	p = 0,645	[n.S.]
Dimethoate	d <sub>5</sub>	50,00% ± 5,01	p = 8,586 × 10 <sup>-6</sup>	***]
	d <sub>6</sub>	75,93% ± 4,49	p = 3,160 × 10 <sup>-8</sup>	***]
	d <sub>7</sub>	87,96% ± 4,63	p = 3,385 × 10 <sup>-9</sup>	***]

Signifikanzen: n.S., nicht signifikant ( $p > 0,1$ ), ●, grenzwertig signifikant ( $0,1 > p > 0,05$ ); \*, signifikant ( $0,05 > p > 0,01$ ); \*\*, stark signifikant ( $0,01 > p > 0,001$ ); \*\*\*, hochgradig signifikant ( $p < 0,001$ ).

Gemäß den Testbestimmungen wurden fünf verschiedene Dosen an die Larven verabreicht. Die Mortalität der jeweiligen Gruppen wurde an d<sub>5-7</sub> bestimmt. Bei der Fütterung von T<sub>E</sub> ergaben sich folgende Werte: Bei einer Dosis von 16,5 µg/Larve stellte sich an d<sub>5</sub> eine Mortalität von 4,63% ± 1,46 ein, diese unterscheidet sich signifikant von der Kontrolle. Die Mortalität stieg am folgenden Tag auf 40,74% ± 5,97 an und unterschied sich noch hochgradig signifikant von der entsprechenden Kontrolle. Diese hochgradige Signifikanz bleibt auch an d<sub>7</sub> mit einer Gesamtmortalität von 61,11% ± 5,38 erhalten. Die Fütterung von 5,5 µg/Larve zeigte an d<sub>5</sub> eine Larvensterblichkeit von 1,85% ± 1,22 und wies somit keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle auf. An d<sub>6</sub> steigerte sich die Mortalität der Testgruppe auf 12,04% ± 3,96 und erreichte damit ein grenzwertiges Signifikanzniveau, welches sich an d<sub>7</sub> zu einer hochgradigen Signifikanz bei einer Mortalität von 23,15% ± 4,12 gesteigert hatte. Weiterhin zeigte die Verabreichung von 1,83 µg/Larve an d<sub>5</sub> einen signifikanten Unterschied bei einer



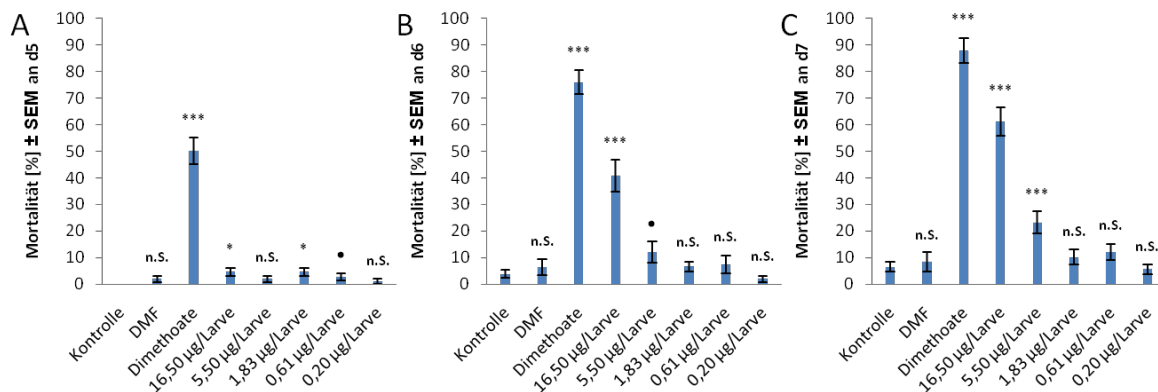
Mortalität von  $4,63\% \pm 1,46$ . Bei einer Dosis von  $0,61 \mu\text{g/Larve}$  fiel dieser mit einer Larvensterblichkeit von  $2,78\% \pm 1,39$  nur noch grenzwertig signifikant auf und fiel auf einen nicht signifikanten Unterschied an d<sub>5</sub> bei einer Verabreichung von  $0,2 \mu\text{g/Larve}$  mit einer Mortalität der Individuen von  $0,93\% \pm 0,93$ . Ab d<sub>6</sub> zeigten sich bei den drei niedrigen Dosen ( $1,83$ ,  $0,61$  und  $0,2 \mu\text{g/Larve}$ ) keine signifikanten Unterschiede zur entsprechenden Kontrolle (Tabelle 31).

**Tabelle 31: Zusammenfassung der statistischen Auswertung der akuten Giftfütterung von T<sub>E</sub> an *A. mellifera*-Larven.**

Dosis		Mortalität [%] $\pm$ SEM	Signifikanz zur Kontrolle
$0,20 \mu\text{g/Larvae}$	d <sub>5</sub>	$0,93 \pm 0,93$	0,3322 [n.S.]
	d <sub>6</sub>	$1,85 \pm 1,22$	0,3404 [n.S.]
	d <sub>7</sub>	$5,56 \pm 1,96$	0,7574 [n.S.]
$0,61 \mu\text{g/Larvae}$	d <sub>5</sub>	$2,78 \pm 1,39$	$8,0520 \times 10^{-2}$ [•]
	d <sub>6</sub>	$7,41 \pm 3,24$	0,3387 [n.S.]
	d <sub>7</sub>	$12,04 \pm 3,14$	0,1416 [n.S.]
$1,83 \mu\text{g/Larve}$	d <sub>5</sub>	$4,63 \pm 1,46$	$1,3350 \times 10^{-2}$ [*]
	d <sub>6</sub>	$6,59 \pm 1,81$	0,2717 [n.S.]
	d <sub>7</sub>	$10,19 \pm 2,70$	0,2646 [n.S.]
$5,50 \mu\text{g/Larve}$	d <sub>5</sub>	$1,85 \pm 1,22$	0,1690 [*]
	d <sub>6</sub>	$12,04 \pm 3,96$	0,0730 [•]
	d <sub>7</sub>	$23,15 \pm 4,12$	$3,3670 \times 10^{-3}$ [***]
$16,50 \mu\text{g/Larve}$	d <sub>5</sub>	$4,63 \pm 1,46$	0,0130 [*]
	d <sub>6</sub>	$40,74 \pm 5,97$	$1,9520 \times 10^{-4}$ [***]
	d <sub>7</sub>	$61,11 \pm 1,96$	$2,5170 \times 10^{-6}$ [***]

Signifikanzen: n.S., nicht signifikant ( $p > 0,1$ ), •, grenzwertig signifikant ( $0,1 > p > 0,05$ ); \*, signifikant ( $0,05 > p > 0,01$ ); \*\*, stark signifikant ( $0,01 > p > 0,001$ ); \*\*\*, hochgradig signifikant ( $p < 0,001$ ).

Eine Visualisierung der entsprechenden Ergebnisse zur Fütterung des T<sub>E</sub> ist in Abbildung 8 dargestellt.



**Abbildung 8: Zunahme der Mortalität von *A. mellifera*-Larven nach der Verabreichung von T<sub>E</sub> an d4.** Mortalität [%]  $\pm$  SEM. Signifikanzen: n.S., nicht signifikant ( $p > 0,1$ ); •, grenzwertig signifikant ( $0,1 > p > 0,05$ ); \*, signifikant ( $0,05 > p > 0,01$ ); \*\*, stark signifikant ( $0,01 > p > 0,001$ ); \*\*\*, hochgradig signifikant ( $p < 0,001$ ). A, Mortalität an d<sub>5</sub>; B, Mortalität an d<sub>6</sub>; C, Mortalität an d<sub>7</sub>.

Die Ergebnisse der oralen Verabreichung von T<sub>E</sub> an Larven der Honigbiene haben gezeigt, dass ab einer Dosis von  $1,83 \mu\text{g/Larve}$ , die an d<sub>4</sub> verabreicht wurde, am Ende der Larvalentwicklung kein signifikanter Unterschied zur entsprechenden Kontrolle in der Mortalität erkennbar war.

Neben dem Trc T<sub>E</sub> wurde auch das T<sub>Mix</sub> auf seine Toxizität gegenüber Bienenlarven getestet. Hierbei haben die Ergebnisse der Studie veranschaulicht, dass eine Dosis von  $16,5 \mu\text{g/Larve}$  bereits an d<sub>5</sub> eine signifikante Erhöhung der Sterblichkeitsrate auf  $18,55\% \pm 5,69$  hervorrief, die sich an d<sub>6</sub> und d<sub>7</sub> auf

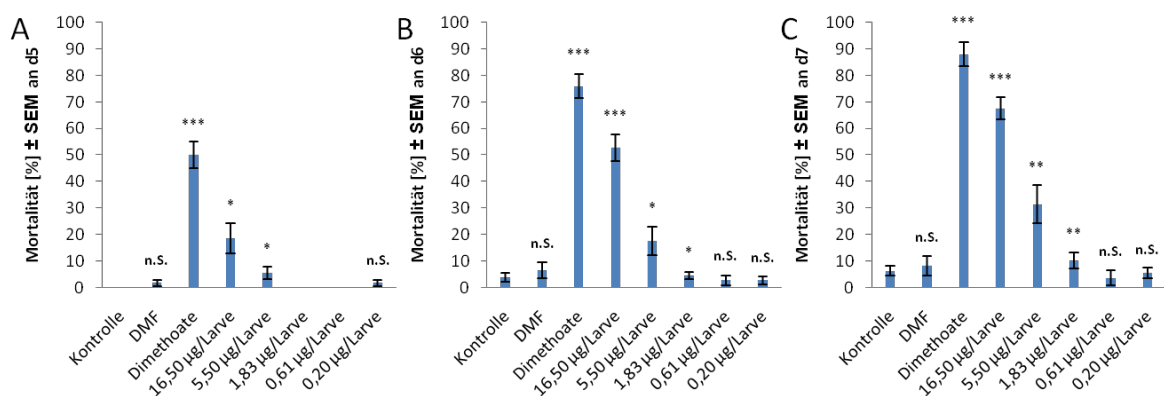
eine hochgradige Signifikanz steigerte. Bei einer Konzentration von 5,5 µg/Larve zeigten sich an d<sub>5</sub> und d<sub>6</sub> signifikante Unterschiede zur Kontrolle, welche an d<sub>7</sub> als stark signifikant mit einer Mortalität von 31,48% ± 7,19 in die Auswertung der Versuchsreihe eingingen. Für 1,83 und 0,61 µg/Larve ließen sich an d<sub>5</sub> keine Mortalitäten bestimmen, da zu diesem Zeitpunkt noch alle Testindividuen am Leben waren. An d<sub>6</sub> lässt sich bei 1,83 µg/Larve eine Mortalität von 4,5% ± 1,46 ausmachen, die einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle darstellte. Am Ende der Versuchsreihe (d<sub>7</sub>) stellte sich dieser Unterschied als stark signifikant mit einer Mortalität von 10,19% ± 3,04 dar. Ab einer Menge von 0,61 µg/Larve ließen sich für T<sub>Mix</sub> keine Auswirkungen auf die Larvensterblichkeit im Vergleich zur Kontrolle feststellen (Tabelle 32).

**Tabelle 32: Zusammenfassung der statistischen Auswertung der akuten Giftfütterung von T<sub>Mix</sub> an *A. mellifera*-Larven.**

Dosis		Mortalität [%] ± SEM	Signifikanz zur Kontrolle
0,20 µg/Larvae	d <sub>5</sub>	1,85 ± 1,23	0,1690 [n.S.]
	d <sub>6</sub>	2,78 ± 1,39	0,6244 [n.S.]
	d <sub>7</sub>	5,56 ± 1,96	0,7574 [n.S.]
0,61 µg/Larvae	d <sub>5</sub>	0,00 ± 0,00	N.A.
	d <sub>6</sub>	2,78 ± 1,96	0,6815 [n.S.]
	d <sub>7</sub>	3,70 ± 2,82	0,4346 [n.S.]
1,83 µg/Larve	d <sub>5</sub>	0,00 ± 0,00	N.A.
	d <sub>6</sub>	4,50 ± 1,46	0,2796 × 10 <sup>-1</sup> [*]
	d <sub>7</sub>	10,19 ± 3,04	3,8230 × 10 <sup>-3</sup> [**]
5,50 µg/Larve	d <sub>5</sub>	5,56 ± 2,41	0,4974 × 10 <sup>-1</sup> [*]
	d <sub>6</sub>	17,59 ± 5,46	3,7760 × 10 <sup>-2</sup> [*]
	d <sub>7</sub>	31,48 ± 7,19	8,0660 × 10 <sup>-3</sup> [**]
16,50 µg/Larve	d <sub>5</sub>	18,55 ± 5,96	1,1610 × 10 <sup>-2</sup> [*]
	d <sub>6</sub>	52,78 ± 5,01	7,4200 × 10 <sup>-8</sup> [***]
	d <sub>7</sub>	67,59 ± 4,04	2,2300 × 10 <sup>-8</sup> [***]

Signifikanzen: n.S., nicht signifikant ( $p > 0,1$ ), ●, grenzwertig signifikant ( $0,1 > p > 0,05$ ); \*, signifikant ( $0,05 > p > 0,01$ ); \*\*, stark signifikant ( $0,01 > p > 0,001$ ); \*\*\*, hochgradig signifikant ( $p < 0,001$ ).

Eine Visualisierung der Ergebnisse zur Toxizität des Trcs T<sub>Mix</sub> ist in Abbildung 9 angefügt.



**Abbildung 9: Zunahme der Mortalität von *A. mellifera*-Larven nach der Verabreichung von T<sub>Mix</sub> an d4.** Mortalität [%] ± SEM. Signifikanzen: n.S., nicht signifikant ( $p > 0,1$ ); ●, grenzwertig signifikant ( $0,1 > p > 0,05$ ); \*, signifikant ( $0,05 > p > 0,01$ ); \*\*, stark signifikant ( $0,01 > p > 0,001$ ); \*\*\*, hochgradig signifikant ( $p < 0,001$ ). A, Mortalität an d<sub>5</sub>; B, Mortalität an d<sub>6</sub>; C, Mortalität an d<sub>7</sub>.

Die Ergebnisse der Testreihe zu T<sub>Mix</sub> zeigten, dass ab einer Dosis von 0,61 µg/Larve keine signifikanten Unterschiede zur entsprechenden Kontrolle in der Larvalentwicklung auftraten.

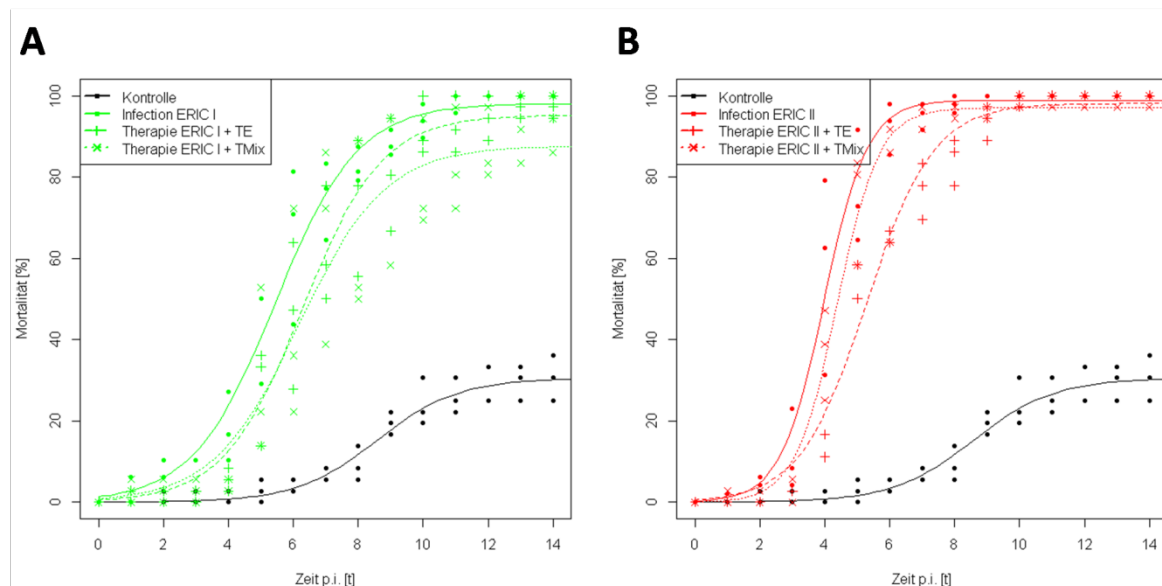
Neben der Mortalität wurde am Ende der Tests (d<sub>7</sub>) festgestellt, dass sich die Larven vermehrt in einem atypischen Entwicklungsstand befanden. So verblieb ein Großteil der Larven im vorherigen Larvenstadium und eine Aufrichtung in das Vorpuppenstadium nebst Defäkalisierung blieb aus.

Im Rahmen dieser *in vivo*-Versuchsreihe konnte die Dosisgrenze der Trcs zur biologischen Aktivität gegenüber Bienenbrut aufgezeigt werden. Konzentrationen von  $\leq 1,83 \mu\text{g/Larve}$  T<sub>E</sub> an d<sub>4</sub> zeigten am Ende der Larvalentwicklung keinen signifikanten Einfluss auf die Mortalität. Bei T<sub>Mix</sub> galt dies für Konzentrationen von  $\leq 0,61 \mu\text{g/Larve}$ . Jedoch ließen sich Verhaltensauffälligkeiten und Entwicklungsrückstände bei den behandelten Larven beobachten.

### 5.2.3 *In vivo*-Studien zur Wirksamkeit der Trcs gegen *P. larvae* in Bienenbrut

In dieser Arbeit konnte in ersten Versuchen die Dosis für die Trcs T<sub>E</sub> und T<sub>Mix</sub> festgestellt werden, ab der keine Einflüsse auf die Sterblichkeit der Bienenbrut während der Larvalentwicklung zu erwarten waren. Ferner konnte gezeigt werden, dass die MHK der Bienenpathogene gegenüber T<sub>E</sub> niedriger lag als die der getesteten Mikrobiombakterien. Aus diesen Gründen wurde die Eignung der Trcs als Therapeutikum im Kampf gegen die AFB untersucht. Hierzu wurden Larven mit *P. larvae* ERIC I oder II infiziert und an d<sub>4</sub> mit T<sub>E</sub> oder mit T<sub>Mix</sub> therapiert. Die Mortalität der Bienenbrut wurde bis d<sub>15</sub> dokumentiert. Als Kontrolle wurden nicht infizierte Larven herangezogen, für die Werte zur Infektion mit *P. larvae* wurden die Ergebnisse aus der Versuchsreihe der Phagentherapie mit dem Bakteriophagen HB10c2 (5.3.3.1) herangezogen (Beims *et al.*, 2015).

Im Rahmen dieser Versuchsreihe wurden die Larven an d<sub>1</sub> mit 500 Sporen des entsprechenden *P. larvae*-Genotypen infiziert. An d<sub>4</sub> erhielten die Larven die Trcs (T<sub>E</sub>,  $1,83 \mu\text{g/Larve}$ ; T<sub>Mix</sub>,  $0,61 \mu\text{g/Larve}$ ) als Therapeutikum verabreicht. Die Mortalität der Individuen wurde täglich dokumentiert. Der Verlauf der Mortalitäten der verschiedenen Testgruppen ist in Abbildung 10 dargestellt.



**Abbildung 10: Mortalität der Bienenbrut im Therapieversuch mit den Trcs T<sub>E</sub> und T<sub>Mix</sub> bei Infektion mit *P. larvae* ERIC I (A) und ERIC II (B).** Infektion der Larven an d<sub>0</sub> mit 500 Sporen/Larve. Applikation der Trcs (T<sub>E</sub>= $1,83 \mu\text{g/Larve}$ , T<sub>Mix</sub>= $0,61 \mu\text{g/Larve}$ ) an d<sub>4</sub>. Die Kontrolle stellt die Mortalität gesunder Larven ohne Applikation der Trcs dar.

Die Verabreichung der Trcs an die infizierten Larven erfolgte an d<sub>4</sub>. Vor der Applikation betrug die Mortalität  $1,85\% \pm 0,93$  für die Kontrollgruppe. Da zu diesem Zeitpunkt die Verabreichung der Trcs

noch nicht stattgefunden hatte, lagen drei Gruppen für die Infektionen mit dem jeweiligen *P. larvae*-Genotypen vor. Dabei wiesen die Gruppen Larvensterblichkeiten von 2,78-10,42% auf. Vergleicht man diese Mortalitäten miteinander so ist ersichtlich, dass sich lediglich die Werte der Infektionsgruppe ERIC I<sub>Infektion</sub> signifikant von den übrigen Werten an d<sub>4</sub> (t=3 d p.i.) unterschieden (Tabelle 33).

**Tabelle 33: Mortalität der *A. mellifera*-Larven vor Verabreichung der Trcs im *in vivo*-Therapieversuch.** SEM, Standardfehler des Mittelwertes. Signifikanzen: n.S., nicht signifikant ( $p > 0,1$ ); ●, grenzwertig signifikant ( $0,1 > p > 0,05$ ); \*, signifikant ( $0,05 > p > 0,01$ ); \*\*, stark signifikant ( $0,01 > p > 0,001$ ); \*\*\*, hochgradig signifikant ( $p < 0,001$ ).

Gruppe	Mortalität [%] ± SEM an d <sub>4</sub> (3 d p.i.); Signifikanz	
Kontrolle	1,85% ± 0,93;	p <sub>ERIC I Infektion</sub> = 1,149 × 10 <sup>-3</sup> [ * ]
ERIC I <sub>Infektion</sub>	10,42% ± 0,00; p <sub>Kontrolle</sub> = 1,149 × 10 <sup>-2</sup> [ * ]	
ERIC I <sub>TE</sub>	1,85% ± 0,93; p <sub>Kontrolle</sub> = 1 [n.S.]	p <sub>ERIC I Infektion</sub> = 1,149 × 10 <sup>-3</sup> [ * ]
ERIC I <sub>TMix</sub>	2,78% ± 1,60; p <sub>Kontrolle</sub> = 6,433 × 10 <sup>-1</sup> [n.S.]	p <sub>ERIC I Infektion</sub> = 4,136 × 10 <sup>-3</sup> [ * ]
ERIC II <sub>Infektion</sub>	11,81% ± 5,68; p <sub>Kontrolle</sub> = 1,600 × 10 <sup>-1</sup> [n.S.]	p <sub>ERIC I Infektion</sub> = 0,830 [ * ]
ERIC II <sub>TE</sub>	2,78% ± 0,00; p <sub>Kontrolle</sub> = 4,226 × 10 <sup>-1</sup> [n.S.]	p <sub>ERIC I Infektion</sub> = N.A.
ERIC II <sub>TMix</sub>	3,70% ± 1,85; p <sub>Kontrolle</sub> = 4,216 × 10 <sup>-1</sup> [n.S.]	p <sub>ERIC I Infektion</sub> = 6,839 × 10 <sup>-2</sup> [ ● ]

Für die Kontrollgruppe wurde eine finale Mortalität von 30,56% ± 3,21 festgestellt. Die Infektionen mit *P. larvae* ERIC I (DSM 7030) führten zu einer Sterblichkeit von 100% ± 0, wobei die LT<sub>100</sub> 12 d nach der Infektion der L1-Larven eintrat. Bei *P. larvae* ERIC II wurde die LT<sub>100</sub> nach 9 d erreicht, sodass auch in dieser Gruppe eine finale Mortalität von 100% ± 0 festgestellt werden konnte.

Durch die Verabreichung des T<sub>E</sub> konnte die Sterblichkeitsrate auf 97,22% ± 0 für den Genotyp ERIC I gesenkt werden, beim Genotyp ERIC II blieb diese unverändert bei 100% ± 0, wobei die LT<sub>100</sub> jedoch erst 11 d nach der Infektion erreicht wurde. Signifikante Unterschiede bezogen auf die Gesamtmortalität ließen sich durch die Verabreichung des T<sub>E</sub> nicht feststellen (Tabelle 34).

Die Applikation des T<sub>Mix</sub> führte bei ERIC I zu einer finalen Mortalität von 93,52% ± 4,04. Im Falle der vorangegangenen Infektion mit dem Genotypen ERIC II ließ sich eine finale Sterblichkeitsrate von 99,07% ± 0,93 feststellen. Bezogen auf die Gesamtmortalität nach Verabreichung des T<sub>Mix</sub> konnten keine signifikanten Unterschiede gezeigt werden (Tabelle 34).

**Tabelle 34: Mortalität der *A. mellifera*-Brut im *in vivo*-Therapieversuch.** SEM, Standardfehler des Mittelwertes. Signifikanzen: n.S., nicht signifikant ( $p > 0,1$ ); ●, grenzwertig signifikant ( $0,1 > p > 0,05$ ); \*, signifikant ( $0,05 > p > 0,01$ ); \*\*, stark signifikant ( $0,01 > p > 0,001$ ); \*\*\*, hochgradig signifikant ( $p < 0,001$ ).

Gruppe	Mortalität [%] ± SEM an d <sub>15</sub> (14 d p.i.)	Signifikanz
Kontrolle	30,56% ± 3,21	p <sub>ERIC I</sub> = 2,127 × 10 <sup>-3</sup> [ ** ] p <sub>ERIC II</sub> = 2,217 × 10 <sup>-3</sup> [ ** ]
ERIC I <sub>Infektion</sub>	100,00% ± 0,00	p <sub>ERIC ITE</sub> = 2,254 × 10 <sup>-1</sup> [n.S.] p <sub>ERIC ITMix</sub> = 2,495 × 10 <sup>-1</sup> [n.S.]
ERIC I <sub>TE</sub>	97,22% ± 1,60	p <sub>Kontrolle</sub> = 4,930 × 10 <sup>-2</sup> [ * ]
ERIC I <sub>TMix</sub>	93,52% ± 4,04	p <sub>Kontrolle</sub> = 2,580 × 10 <sup>-4</sup> [***]
ERIC II <sub>Infektion</sub>	100,00% ± 0,00	N.A. p <sub>ERIC IITMix</sub> = 4,226 × 10 <sup>-1</sup> [n.S.]
ERIC II <sub>TE</sub>	100,00% ± 0,00	p <sub>Kontrolle</sub> = 2,127 × 10 <sup>-2</sup> [ ** ]
ERIC II <sub>TMix</sub>	99,07% ± 0,93	p <sub>Kontrolle</sub> = 3,329 × 10 <sup>-5</sup> [***]

Neben den Individualmortalitäten konnte ferner beobachtet werden, dass die Larven eine atypische Entwicklung aufwiesen. Ein Großteil der Larven verharrte bis zum Ende des Versuches im

Larvenstadium. Eine Defekalierung nebst Aufrichten der Larven in der Zelle als Indiz für das Puppenstadium konnte bei den betreffenden Larven nicht beobachtet werden.

Die *in vivo*-Versuche zur Eignung der Trcs T<sub>E</sub> und T<sub>Mix</sub> als Therapeutikum im Kampf gegen die AFB haben gezeigt, dass sich bezogen auf die Gesamtmortalität für die Genotypen ERIC I und II von *P. larvae* nach 14 d keine signifikanten Unterschiede feststellen ließen. Jedoch schien der Mortalitätsverlauf verglichen mit den reinen Infektionen um circa 24-48 h verzögert zu sein. Zudem wiesen die Individuen eine atypische Entwicklung auf.

### 5.3 Bakteriophagen als potentielles Therapeutikum der AFB

#### 5.3.1 Isolation von *P. larvae*-spezifischen Bakteriophagen

Zu Beginn dieser Arbeit lagen bereits sieben Isolate *P. larvae*-spezifischer Bakteriophagen vor. Dabei handelte es sich um die Phagen HB1, HB2, HB4, HB10c2, HB12, HB13 und HB16 (Beims, 2012b, 2013). Aus Faulbrutschleim konnten im Rahmen dieser Arbeit die Bakteriophagen HBWf und HBA isoliert werden. Das Isolat HB $\chi$  wurde aus einer Wabe isoliert, in der sich *P. larvae* nicht nachweisen ließ. Somit wurden in dieser Arbeit Bakteriophagen verwendet, die aus vier verschiedenen Quellen (Faulbrutschleim, Futterkranzproben, *P. larvae*-Kulturen und Wabenmaterial ohne Erregernachweis) isoliert werden konnten. Die zehn Isolate wiesen jeweils lytische Wirkungen gegenüber den vier Referenzstämmen der Genotypen ERIC I-IV von *P. larvae* auf, ferner konnte gezeigt werden, dass 20 zufällig ausgewählte Umweltisolate der Genotypen ERIC I und II (Beims *et al.*, 2015) sensitiv gegenüber den verwendeten Bakteriophagenisolaten reagierten.

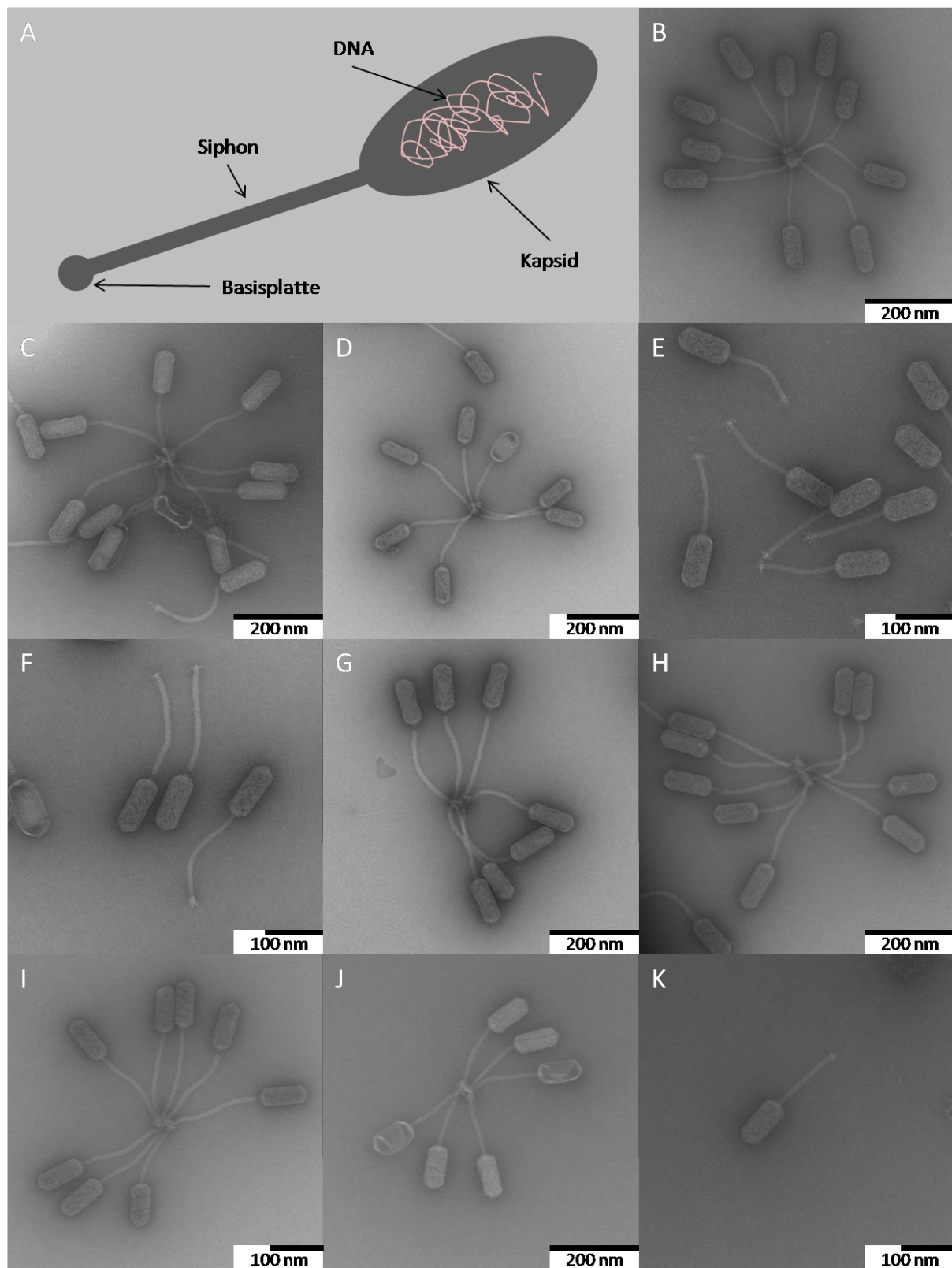
#### 5.3.2 Charakterisierung der isolierten Bakteriophagen

Die zehn vorliegenden Bakteriophagenisolate wurden im Rahmen dieser Arbeit zunächst charakterisiert. In einem ersten Schritt wurde eine grobe Klassifizierung anhand der Morphologie vorgenommen. Phylogenetische Charakterisierungen erfolgten anschließend durch Restriktionskartierungen. Um potentielle Risiken im Rahmen einer Freiland-Phagentherapie auszuschließen wurden die Bakteriophagen vor dem *in vivo*-Larvenassay hinsichtlich ihrer Lysogenie, Effizienz und ihres Wirtsspektrums untersucht.

##### 5.3.2.1 Morphologische Charakterisierung der Bakteriophagen

Um mögliche morphologische Unterschiede zwischen den Bakteriophagen zu identifizieren wurden diese mittels TEM charakterisiert. Die vorhandenen Bakteriophagenisolate wurden zunächst über einen CsCl-Dichtegradienten aufgereinigt und gegen TM-Puffer dialysiert. Die so erhaltenen hochtitrigen Phagenlysate wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Manfred Rohde (HZI, Braunschweig) hinsichtlich ihrer Morphologie mit dem Transelektronenmikroskop untersucht.

Die Phagenisolate zeichneten sich durch eine einheitliche Morphologie aus. So wiesen die einzelnen Bakteriophagen ein längliches Kapsid auf, an dem sich ein biegsamer Siphon mit einer Basisplatte befand. Stellvertretend für die zehn Isolate wurden die Parameter an Präparaten des Bakteriophagen HB10c2 bestimmt (Mittelwert  $\pm$  Standardfehler). Die Kapside hatten eine Länge von  $98,54 \pm 0,54$  nm und eine Breite von  $46,79 \pm 0,56$  nm. Der Siphon zeichnete sich durch eine Länge von  $165,30 \pm 19,09$  nm in der Länge und  $10,32 \pm 0,21$  nm im Durchmesser aus. Die Basisplatte der Bakteriophagen wies einen Durchmesser von  $22,77 \pm 0,62$  nm auf. Basierend auf den morphologischen Eigenschaften ließen sich die Phagenisolate als Teil der *Siphoviridae* klassifizieren und wiesen dabei den B2-Morphotyp auf (King *et al.*, 2012; Stahly *et al.*, 1999).



**Abbildung 11: Transelektronenmikroskopische Aufnahme der Bakteriophagenisolate nach Negativkontrastierung.** A, Schematische Darstellung eines Bakteriophagen aus der Familie der Siphoviridae; B, Bakteriophage HB1; C, Bakteriophage HB2; D, Bakteriophage HB4; E, Bakteriophage HB10c2; F, Bakteriophage HB12; G, Bakteriophage HB13; H, Bakteriophage HB16; I, Bakteriophage HB-A; J, Bakteriophage HBx; K, Bakteriophage HB-Wf.



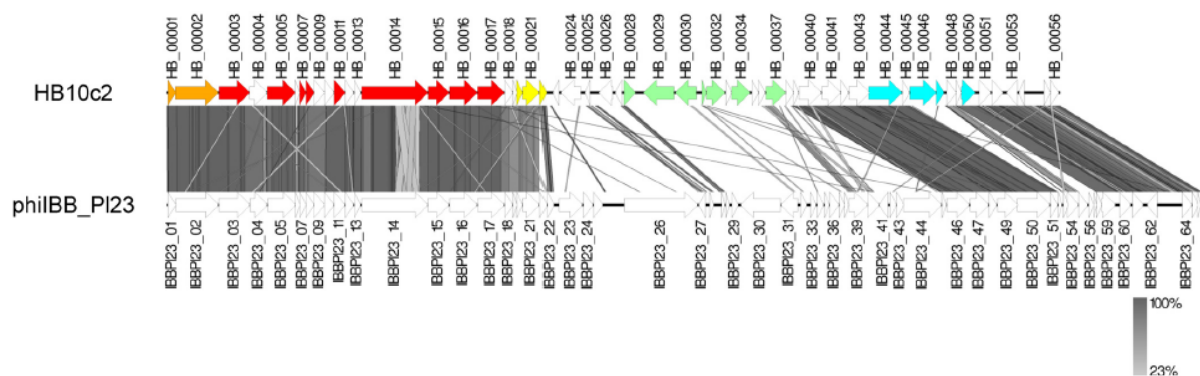
Im Rahmen der elektronenmikroskopischen Betrachtungen fiel auf, dass die Bakteriophagenisolate HB10c2, HB12 und HB-Wf als einzelne Phagenpartikel in dem betrachteten Präparat vorlagen. Die Partikel der übrigen Isolate lagerten sich an den Basisplatten in Gruppen von etwa 6 bis 10 Phagen zusammen.

Die Elektronenmikroskopie zeigte, dass es sich bei allen zehn Phagenisolaten um *Siphoviridae* vom B2-Morphotypen handelte.

### 5.3.2.2 Phylogenetische Charakterisierung der Bakteriophagen

Um eine tiefgreifendere Charakterisierung der Bakteriophagen neben morphologischen Eigenschaften vorzunehmen, erfolgten weitere Schritte auf molekularbiologischer Ebene: Die phylogenetische Charakterisierung der Bakteriophagenisolate wurde anhand von DNA-basierten Verfahren durchgeführt. Hierzu wurde zunächst die Phagen-DNA aus Phagenlysaten isoliert (s. 4.9.1).

In einem ersten Versuch wurde die DNA des Bakteriophagen HB10c2 isoliert und sequenziert (GenBank accession no. KP202972.1). Auswertung und Sequenzierung erfolgten mit Dr. Johannes Wittmann und Dr. Boyke Bunk (DSMZ, Braunschweig). Die lineare, doppelsträngige DNA dieses Bakteriophagen HB10c2 wies eine Länge von 35.644 bp und einen GC-Gehalt von 41,8% auf. Basierend auf der Annotation des Genoms konnten 56 kodierende Sequenzen (CDS) anhand von verschiedenen Startcodons (52 x ATG, 2 x GTG, 2 x TTG) und Shine-Delgarno-Sequenzen nachgewiesen werden. Das Genom und sein struktureller Aufbau wiesen starke Homologien zum Bakteriophagen phiIBB\_PI23 (GenBank accession no. KP296792) auf (Abbildung 12). Im Rahmen der Genomanalyse konnte das Genom in fünf funktionelle Cluster aufgeteilt werden. Hierzu zählten beispielsweise Strukturgene, Gene für die Replikation, Gene zur Verpackung der Phagen-DNA, an der Wirtslise beteiligte Gene und Gene zur Lysogenie.



**Abbildung 12: Vergleich der Genomstrukturen der Bakteriophagen HB10c2 und phiIBB\_PI23.** Farbliche Markierung der funktionellen Cluster: orange, Verpacken von DNA; rot, Strukturgene; blau, Replikationsgene; gelb, Gene zur Wirtszelllyse; grün, an der Lyse beteiligte Gene.

Weiterhin konnten im Genom des Bakteriophagen HB10c2 eine Integrase (HB\_00029), eine putative  $\beta$ -Lactamase (HB\_00041) und eine N-acetylmuramoyl-L-alanin-Amidase (HB\_00021) nachgewiesen werden. Die putative  $\beta$ -Lactamase weist hohe Homologien zur putativen Metallo-Hydrolase YycJ aus dem Bakteriophagen phiIBB\_PI23 (CDS: AJD83053.1) auf. Ferner konnte eine Cytosin-C5-spezifische DNA-Methylase (HB\_00046) identifiziert werden.

Für eine erste Charakterisierung der zehn vorhandenen Bakteriophagenisolate wurden diese zunächst auf Grund ihrer Restriktionsmuster klassifiziert. Dazu wurde die DNA aus MiniLysaten isoliert und

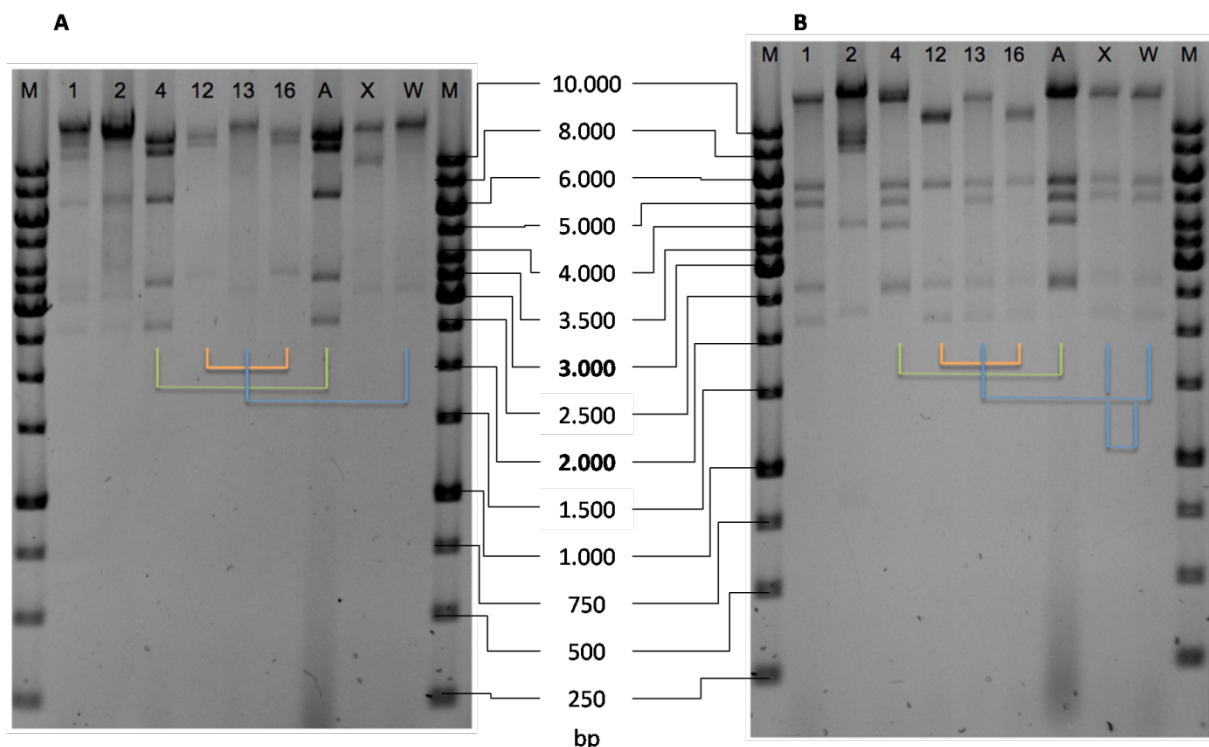


mit den Restriktionsendonukleasen BamHI und KpnI verdaut. Die Produkte wurden anschließend in einem Agarosegel aufgetrennt und visualisiert.

Durch die Restriktion der Phagen-DNA mit der Restriktionsendonuklease BamHI ließen sich sechs verschiedene Fragmentcluster detektieren. Die Abschätzung der Fragmentgröße wurde anhand des mit aufgetrennten Markers vorgenommen (Abbildung 13A und Abbildung 14B).

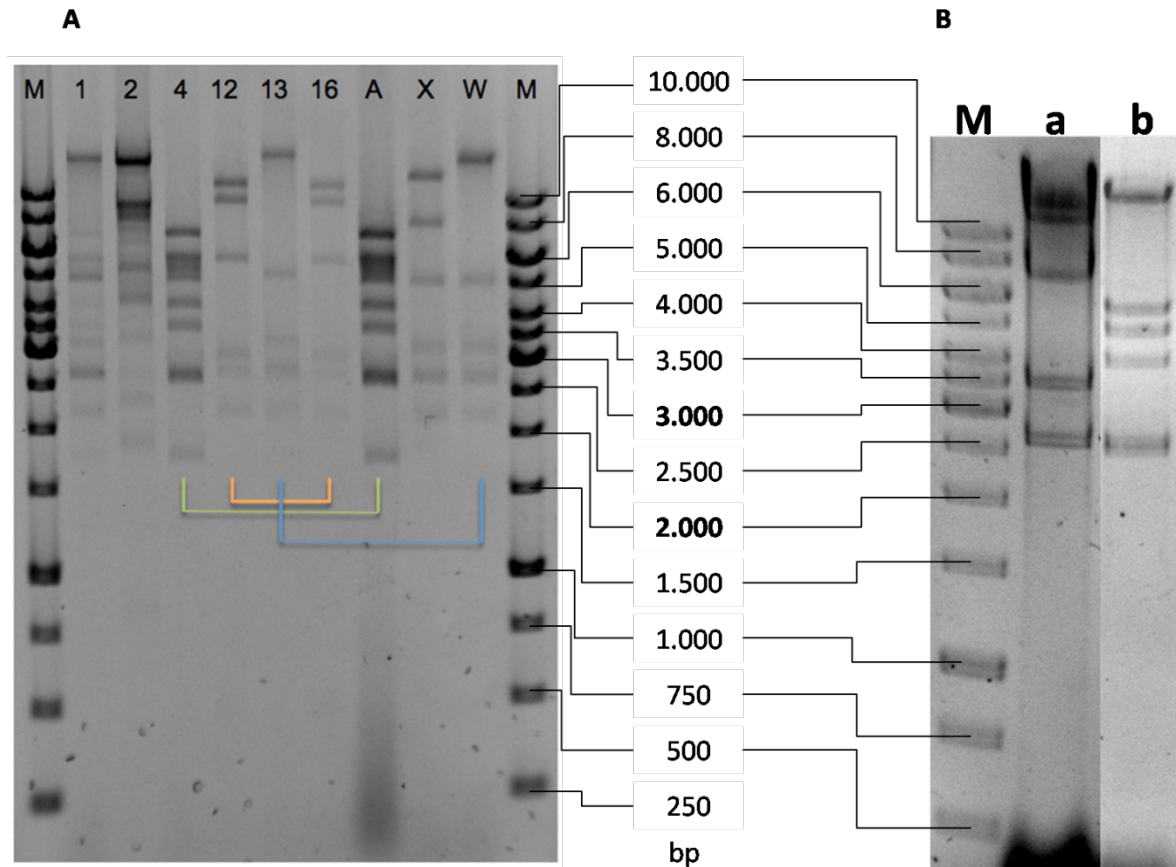
Der Cluster-Typ BamHI<sub>1</sub> beinhaltete das Bakteriophagenisolat HB1 und wies sechs Fragmente auf. Der Bakteriophage HB2 wies ein Restriktionsmuster mit fünf Fragmenten auf und stellte den Cluster-Typ BamHI<sub>2</sub> dar. Die Bakteriophagenisolate HB4, HB10c2 und HB-A zeichneten sich nach dem Verdau mit BamHI durch gleiche Fragmentmuster aus und stellten den Cluster-Typ BamHI<sub>3</sub> dar. Ein weiterer Cluster-Typ (BamHI<sub>4</sub>) wurde durch die Restriktionsmuster der Bakteriophagenisolate HB12 und HB16 dargestellt. Die zwei Restriktionsprodukte der Bakteriophagenisolate HB13 und HB-Wf stellten mit ihren zwei Fragmenten den Cluster-Typ BamHI<sub>5</sub> dar. Der Bakteriophage HB $\chi$  zeigte in der Visualisierung den sechsten Cluster-Typ (BamHI<sub>6</sub>) mit einer Summe von drei Fragmenten (Tabelle 35).

Weitere fünf Restriktionscluster konnten nach der Restriktion der Bakteriophagen-DNA mit der Restriktionsendonuklease KpnI detektiert werden. Die Cluster-Typen KpnI<sub>1</sub> bis KpnI<sub>4</sub> beinhalteten dieselben Bakteriophagenisolate wie die BamHI-Cluster-Typen BamHI<sub>1</sub> bis BamHI<sub>4</sub>, jedoch unterschieden sich die Fragmentgrößen (Abbildung 13B und Abbildung 14B). Der fünfte Cluster-Typ (KpnI<sub>5</sub>) beinhaltete die Bakteriophagenisolate HB13, HB $\chi$  und HB-Wf, die jeweils fünf Restriktionsfragmente aufwiesen (Tabelle 35).



**Abbildung 13: Restriktionsmuster der Phagen-DNA nach Restriktion mit BamHI (A) und KpnI (B).** M, GeneRuler 1kb DNA Ladder; 1, Bakteriophage HB1; 2, Bakteriophage HB2; 4, Bakteriophage HB4; 12, Bakteriophage HB12; 13, Bakteriophage HB13; 16, Bakteriophage HB16; A, Bakteriophage HB-A; X, Bakteriophage HB $\chi$ ; W, Bakteriophage HB-Wf. Fragmentcluster mit mehreren Bakteriophagen wurden durch Klammern verdeutlicht: grün, Cluster-Typ<sub>3</sub>; orange, Cluster-Typ<sub>4</sub>; blau, Cluster-Typ<sub>5</sub>.

Der kombinierte Restriktionsverdau der Bakteriophagen-DNA mit den Restriktionsendonuklease BamHI und KpnI lieferte als Ergebnis sechs verschiedene Fragmentcluster-Typen (Abbildung 14A). Diese Cluster-Typen enthielten die gleichen Bakteriophagenisolate wie die aus dem Verdau mit der Restriktionsendonuklease BamHI (**Tabelle 35**).



**Abbildung 14: Restriktionsmuster der Phagen-DNA nach kombiniertem Restriktionsverdau mit BamHI und KpnI (A) und der DNA des Bakteriophagen HB10c2 mit BamHI oder KpnI (B).** M, GeneRuler 1kb DNA Ladder; 1, Bakteriophage HB1; 2, Bakteriophage HB2; 4, Bakteriophage HB4; 12, Bakteriophage HB12; 13, Bakteriophage HB13; 16, Bakteriophage HB16; A, Bakteriophage HB-A; X, Bakteriophage HB $\chi$ ; W, Bakteriophage HB-Wf; a, Bakteriophage HB10c2 + BamHI; b, Bakteriophage HB10c2 + KpnI. Fragmentcluster-Typen mit mehreren Bakteriophagen wurden durch Klammern verdeutlicht: grün, Cluster-Typ<sub>3</sub>; orange, Cluster-Typ<sub>4</sub>; blau, Cluster-Typ<sub>5</sub>.

**Tabelle 35: Ergebnisse der Restriktionsverdaue der Phagen-DNA zur Erstellung phylogenetischer Cluster-Typen.**

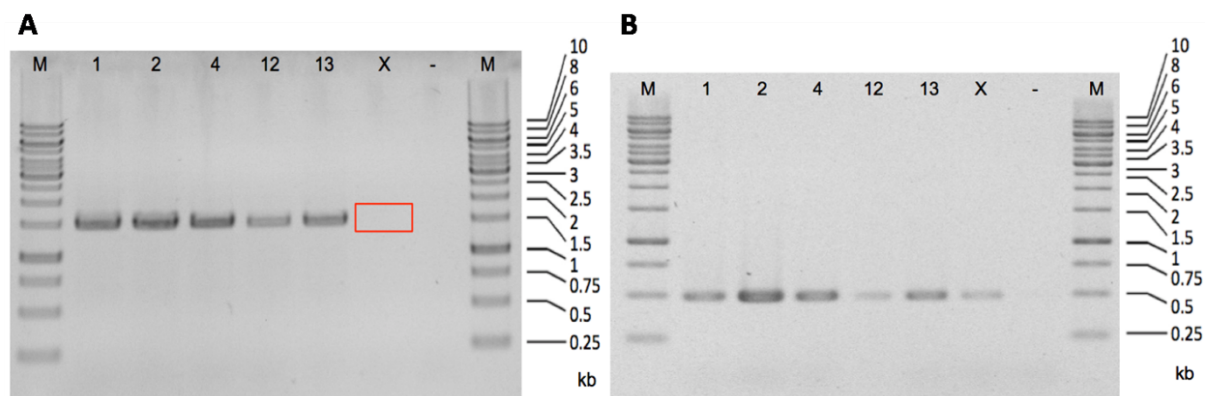
Restriktionsendo-nuklease	Cluster-Typ	Phagen-Isolat	Fragmentgröße(n) [kbp]
BamHI	BamHI <sub>1</sub>	HB1	2 x >10,0; 6,8; 3,5; 3,2; 2,7
	BamHI <sub>2</sub>	HB2	>10,0; 7,0; 4,2; 3,2; 2,7
	BamHI <sub>3</sub>	HB4, HB10c2, HB-A	2 x >10,0; 7,0; 3,6; 2,7
	BamHI <sub>4</sub>	HB12, HB16	2 x >10,0; 3,7
	BamHI <sub>5</sub>	HB13, HB-Wf	>10,0; 3,1
	BamHI <sub>6</sub>	HB $\chi$	>10,0; 10,0; 3,1
KpnI	KpnI <sub>1</sub>	HB1	>10,0; 6,0; 5,0; 4,0; 2,7; 2,2
	KpnI <sub>2</sub>	HB2	>10,0; 10,0; 9,0; 8,0; 4,0; 2,3
	KpnI <sub>3</sub>	HB4, HB10c2, HB-A	2 x >10,0; 6,0; 5,0; 4,0; 2,7
	KpnI <sub>4</sub>	HB12, HB16	>10,0; 6,0; 2,7; 2,2
	KpnI <sub>5</sub>	HB13, HB $\chi$ , HB-Wf	>10,0; 6,0; 5,0; 2,7; 2,2
BamHI/KpnI	BamHI/KpnI <sub>1</sub>	HB1	>10; 7; 5,5; 4,9; 4; 3,5; 3; 2,6; 2,1

BamHI/KpnI <sub>2</sub>	HB2	2 x >10; 9; 8; 5,6; 4,5; 3,5; 3,1; 2,9
BamHI/KpnI <sub>3</sub>	HB4, HB10c2, HB-A	7,8; 6; 5,8; 5,2; 4,2; 3,7; 3; 2,8; 2,3
BamHI/KpnI <sub>4</sub>	HB12, HB16	>10; 10; 6; 3; 2,6; 2,3
BamHI/KpnI <sub>5</sub>	HB13, HB-Wf	>10; 5,5; 3,5; 3,3; 2,7
BamHI/KpnI <sub>6</sub>	HB $\chi$	>10; 8; 5; 3,2; 2,7; 2,2

Im Rahmen der Restriktionsverdaue der Phagen-DNA konnten unterschiedliche Clustertypen für die jeweiligen Restriktionsenzyme festgestellt werden. Durch diese Ergebnisse wurde von sechs unterschiedlichen Bakteriophagen ausgegangen, die jeweils von einem Restriktionscluster-Typen mit den verschiedenen Isolaten repräsentiert wurden. Für die folgenden Versuche wurden exemplarisch für die jeweiligen Cluster-Typen die Bakteriophagen HB1, HB2, HB4, HB12, HB13 und HB $\chi$  ausgewählt und weiter analysiert.

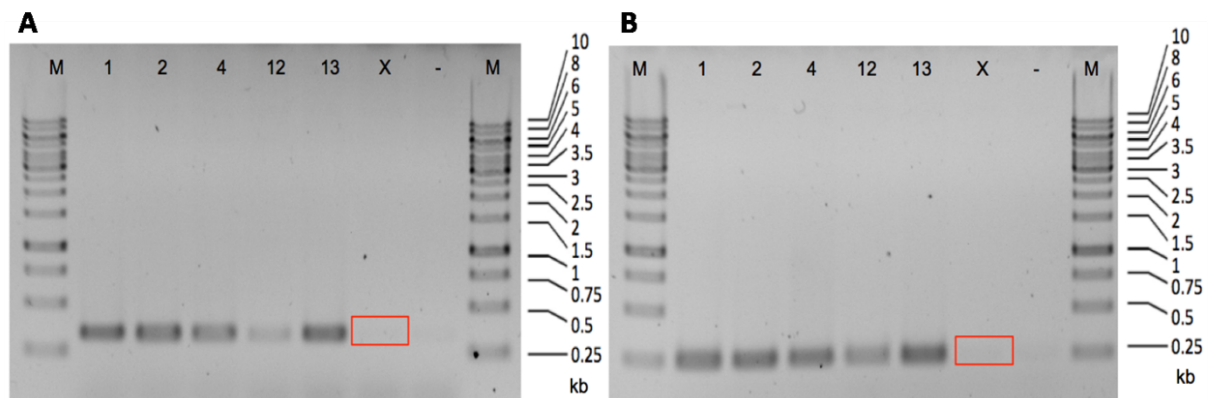
Basierend auf den Restriktionsclustern der Bakteriophagenisolate wurde in weiteren Versuchen die DNA jeweils eines Vertreters pro Cluster isoliert und mittels PCR auf die Abundanz verschiedener Markergene aus dem Bakteriophagen HB10c2 (GenBank accession no. KP202972.1) untersucht. Dazu wurden die Genabschnitte der Basen 6.154-6.492 (Produkt: 339 bp) und 44.971-45.219 (Produkt: 249 bp) zum Nachweis der putativen  $\beta$ -Lactamase amplifiziert. Der Nachweis der Integrase erfolgte über CDS HB\_00029. Die N-acetylmuramoyl-L-alanin-Amidase (HB\_00021) wurde ebenfalls über die Amplifikation der entsprechenden CDS nachgewiesen.

Der Nachweis der N-acetylmuramoyl-L-alanin-Amidase konnte bei allen getesteten sechs Phagenisolaten über die Amplifikation des entsprechenden Gens erbracht werden (Abbildung 15B). Die Integrase konnte außer im Bakteriophagen HB $\chi$  ebenfalls nachgewiesen werden (Abbildung 15A).



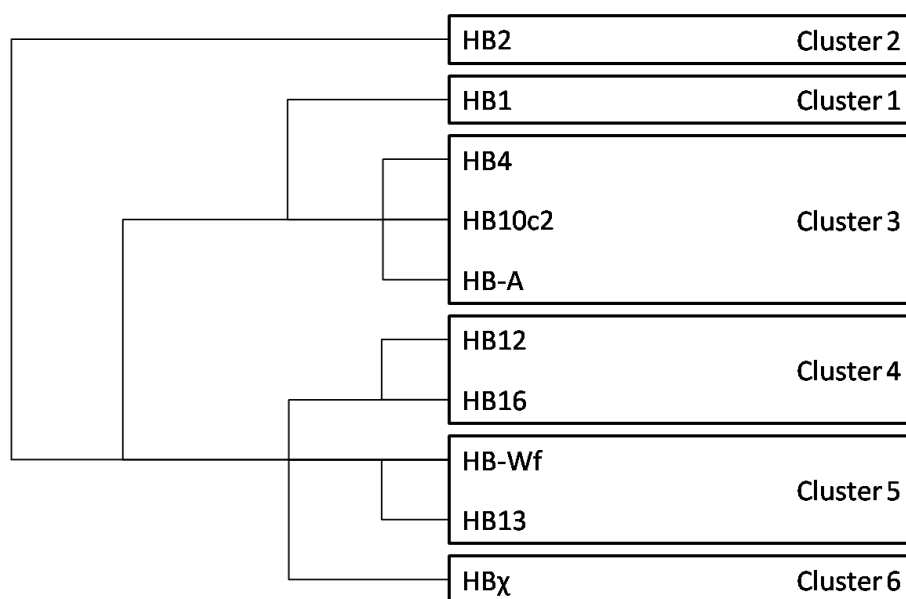
**Abbildung 15: Nachweis der Integrase-Sequenz (A) und N-acetylmuramoyl-L-alanin-Amidase-Sequenz (B) aus HB10c2 in verschiedenen Phagenisolaten.** M, Marker (GeneRuler 1kb DNA Ladder); 1, Bakteriophage HB1; 2, Bakteriophage HB2; 4, Bakteriophage HB4; 12, Bakteriophage HB12; 13, Bakteriophage HB13; X, Bakteriophage HB $\chi$ ; -, Negativkontrolle.

Über die Amplifikation der beiden zur  $\beta$ -Lactamase aus HB10c2 gehörenden Sequenzbereiche in den verwendeten sechs Phagenisolaten konnte gezeigt werden, dass zugehörige Amplifikate in den Bakteriophagen HB1, HB2, HB4, HB12 und HB13 im Rahmen der PCR amplifiziert werden konnte. Ein Amplifikat entsprechender Größe fehlt im Isolat HB $\chi$ . Daraus lässt sich schlussfolgern, dass eine putative  $\beta$ -Lactamase mit homologer Sequenz zu der des Bakteriophagen HB10c2 und phiIBB\_PI23 in dem Phagen HB $\chi$  nicht detektiert werden konnte.



**Abbildung 16:** Nachweis der putativen  $\beta$ -Lactamase-Sequenzen aus HB10c2 in verschiedenen Phagenisolaten über das Amplifikat der Basen 6.154 – 6.492 (A) und 44.971 – 45.219 (B). M, Marker (GeneRuler 1kb DNA Ladder); 1, Bakteriophage HB1; 2, Bakteriophage HB2; 4, Bakteriophage HB4; 12, Bakteriophage HB12; 13, Bakteriophage HB13; X, Bakteriophage HB $\chi$ ; -, Negativkontrolle.

Basierend auf den Ergebnissen der Restriktionsanalysen und der Abundanz verschiedener Markergene lassen sich erste phylogenetische Beziehungen zwischen den einzelnen Bakteriophagenisolaten rekonstruieren (Abbildung 17).



**Abbildung 17:** Schematische Darstellung der phylogenetischen Beziehungen zwischen den Bakteriophagenisolaten basierend auf den Ergebnissen der Restriktionsanalysen. Die Balkenlänge entspricht keiner phylogenetischen Distanz.

Die Versuche zur DNA-basierten Charakterisierung der zehn vorliegenden Bakteriophagenisolate (Abbildung 17) haben gezeigt, dass sich diese durch Restriktionsfragmentanalysen in sechs verschiedene Cluster-Typen eingruppierten ließen. Die sechs Bakteriophagencluster trugen in ihrem Genom durchgängig das Gen für die N-acetylmuramoyl-L-alanin-Amidase. Die für eine spätere Phagentherapie kritisch erscheinenden Gene der putativen  $\beta$ -Lactamase und Integrase konnten im Genom des Bakteriophagen HB $\chi$  nicht nachgewiesen werden.

### 5.3.2.3 Charakterisierung der bakterio-phagen-spezifischen Wirtsspektren

Über vorangegangene Restriktionsmuster konnten die zehn Bakteriophagenisolate in sechs Cluster eingeteilt werden. Zur Charakterisierung der Wirtsspektren der Bakteriophagen wurde pro Cluster ein

Isolat auf seine Spezifität gegenüber den Referenzstämmen der Genotypen ERIC I-IV von *P. larvae* sowie Umweltisolaten der Genotypen ERIC I und II getestet (Tabelle 36).

**Tabelle 36: Lytische Aktivität der Bakteriophagenisolate gegenüber verschiedenen *P. larvae*-Isolaten.**  
+, lytische Aktivität; -, keine lytische Aktivität.

Genotyp	Stamm	HB1 Cluster1	HB2 Cluster 2	HB10c2 Cluster 3	HB12 Cluster 4	HB13 Cluster 5	HBx Cluster 6
ERIC I	DSM 7030	+	+	+	+	+	+
	Isolat 5	+	+	+	+	+	+
	Isolat 9	+	+	+	+	+	+
	Isolat 11	+	+	+	+	+	+
	Isolat 15	+	+	+	+	+	+
	Isolat 22	+	+	+	+	+	+
	Isolat 24	+	+	+	+	+	+
	Isolat 25	+	+	+	+	+	+
	Isolat 26	+	+	+	+	+	+
	Isolat 29	+	+	+	+	+	+
	Isolat 145	+	+	+	+	+	+
	Isolat 146	+	+	+	+	+	+
	Isolat 147	+	+	+	+	+	+
	Isolat 148	+	+	+	+	+	+
	Isolat 153	+	+	+	+	+	+
	Isolat 155	+	+	+	+	+	+
	Isolat 157	+	+	+	+	+	+
	Isolat 159	+	+	+	+	+	+
	Isolat 160	+	+	+	+	+	+
	Isolat 162	+	+	+	+	+	+
ERIC II	DSM16116	+	+	+	+	+	+
	DSM25430	+	+	+	+	+	+
	Isolat 1	+	+	+	+	+	+
	Isolat 3	+	+	+	+	+	+
	Isolat 6	+	+	+	+	+	+
	Isolat 7	+	+	+	+	+	+
	Isolat 17	+	+	+	+	+	+
	Isolat 20	+	+	+	+	+	+
	Isolat 23	+	+	+	+	+	+
	Isolat 27	+	+	+	+	+	+
	Isolat 28	+	+	+	+	+	+
	Isolat 135	+	+	+	+	+	+
	Isolat 137	+	+	+	+	+	+
	Isolat 144	+	+	+	+	+	+
	Isolat 149	+	+	+	+	+	+
	Isolat 152	+	+	+	+	+	+
	Isolat 156	+	+	+	+	+	+
	Isolat 158	+	+	+	+	+	+
	Isolat 161	+	+	+	+	+	+
	Isolat 168	+	+	+	+	+	+
ERIC III	LMG16252	+	+	+	+	+	+
ERIC IV	LMG16247	+	+	+	+	+	+

Im Rahmen der Versuche konnte gezeigt werden, dass die Bakteriophagen durchgängig eine lytische Aktivität gegenüber allen getesteten *P. larvae*-Stämmen aufwiesen.

Um einen Sicherheitsstandard in potentiellen Feldanwendungen der Bakteriophagen zu gewährleisten, wurde das Wirtsspektrum der Bakteriophagen analysiert. Hierzu wurde die lytische Wirkung der sechs Cluster gegenüber ubiquitären *Bacillales* und Vertretern des bakteriellen Mikrobioms von *A. mellifera* (Larve und Imago) untersucht (Tabelle 37).

Durch diese Versuche konnte gezeigt werden, dass die getesteten Bakteriophagen neben *P. larvae* auch *B. brevis* und acht Arten aus der Gattung *Paenibacillus* (*P. phyllosphaerae*, *P. soli*, *P. humicus*, *P. cookii*, *P. filicis*, *P. lactis*, *P. alvei* und *P. castaneae*) als Wirt nutzen können. Alle alternativen Wirte zählen zu den Gram-positiven Bakterien, von denen lediglich *B. brevis* zum Mikrobiom der Honigbiene zählt. *P. alvei* kommt als Begleitfauna der EFB in der Biene vor. Die übrigen sensitiven *Paenibacillaceae*n konnten bisher nicht als Teil des Mikrobioms nachgewiesen werden.

**Tabelle 37: Lytische Aktivität der Bakteriophagenisolate gegenüber verschiedenen Bakterien.**  
A, Mikrobiom *A. mellifera*-Larve; B, Mikrobiom *A. mellifera*-Imago; C, ubiquitäre *Bacillales*; +, lytische Aktivität; -, keine lytische Aktivität.

Bakterium	Stamm	Vor- kommen	HB1 Cluster 1	HB2 Cluster 2	HB10c2 Cluster 3	HB12 Cluster 4	HB13 Cluster 5	HBx Cluster 6
<i>B. borstelensis</i>	DSM 6347	A	-	-	-	-	-	-
<i>B. licheniformis</i>	LMG 7559	A	-	-	-	-	-	-
<i>B. megaterium</i>	LMG 7127	A	-	-	-	-	-	-
<i>B. pumilus</i>	LMG 3455	A	-	-	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i>	LMG 2099	A	-	-	-	-	-	-
<i>B. brevis</i>	DSM 30	C	+	+	+	+	+	+
<i>B. laterosporus</i>	DSM 25	C	-	-	-	-	-	-
<i>C. denitrificans</i>	LMG21602	A, B	-	-	-	-	-	-
<i>D. acidovorans</i>	LMG 1226	A	-	-	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	DSM20376	A	-	-	-	-	-	-
<i>G. oxydans</i>	DSM 2003	B	-	-	-	-	-	-
<i>J. lividum</i>	LMG 2892	A	-	-	-	-	-	-
<i>K. rosea</i>	DSM20447	A	-	-	-	-	-	-
<i>L. crispatus</i>	LMG 9479	B	-	-	-	-	-	-
<i>P. alvei</i>	DSM 29	C	+	+	+	+	+	+
<i>P. amylolyticus</i>	DSM11730	C	-	-	-	-	-	-
<i>P. apiarius</i>	DSM 5581	C	-	-	-	-	-	-
<i>P. castaneae</i>	DSM19417	C	+	+	+	+	+	+
<i>P. cookii</i>	DSM16944	C	+	+	+	+	+	+
<i>P. elgii</i>	DSM22254	C	-	-	-	-	-	-
<i>P. filicis</i>	DSM23916	C	+	+	+	+	+	+
<i>P. fonticola</i>	DSM21315	C	-	-	-	-	-	-
<i>P. humicus</i>	DSM18784	C	+	+	+	+	+	+
<i>P. lactis</i>	DSM15596	C	+	+	+	+	+	+
<i>P. lautus</i>	DSM 3035	C	-	-	-	-	-	-
<i>P. nanensis</i>	DSM22867	C	-	-	-	-	-	-
<i>P. pabuli</i>	DSM 3036	C	-	-	-	-	-	-
<i>P. peoriae</i>	DSM 8320	C	-	-	-	-	-	-
<i>P. phyllosphaerae</i>	DSM17399	C	+	+	+	+	+	+
<i>P. polymyxa</i>	DSM 36	C	-	-	-	-	-	-
<i>P. popilliae</i>	DSM22700	C	-	-	-	-	-	-
<i>P. soli</i>	DSM21316	C	+	+	+	+	+	+
<i>P. xylanilyticus</i>	DSM17225	C	-	-	-	-	-	-
<i>P. africanus</i>	LMG10345	B	-	-	-	-	-	-

<i>P. okeanokoites</i>	DSM15489	B	-	-	-	-	-	-
<i>P. fluorescens</i>	DSM 6147	A	-	-	-	-	-	-
<i>R. pickettii</i>	LMG 5942	B	-	-	-	-	-	-
<i>S. floricola</i>	LMG23170	B	-	-	-	-	-	-
<i>S. enterica</i>	DSM11320	A, B	-	-	-	-	-	-
<i>S. pasteurii</i>	DSM30868	A	-	-	-	-	-	-
<i>S. salivarius</i>	DSM20067	A	-	-	-	-	-	-
<i>S. griseus</i>	DSM 1471	A	-	-	-	-	-	-

Die Versuche zur Spezifität der Bakteriophagen haben gezeigt, dass neben *P. larvae* neun weitere Bakterien als Wirt genutzt werden können. Hierbei zählen die sensitiven Spezies zu den Gram-positiven Bakterien und gehören in die Klasse der Bacilli.

#### 5.3.2.4 Charakterisierung der Bakteriophagen-Isolate auf Grundlage ihres Proteinspektrums

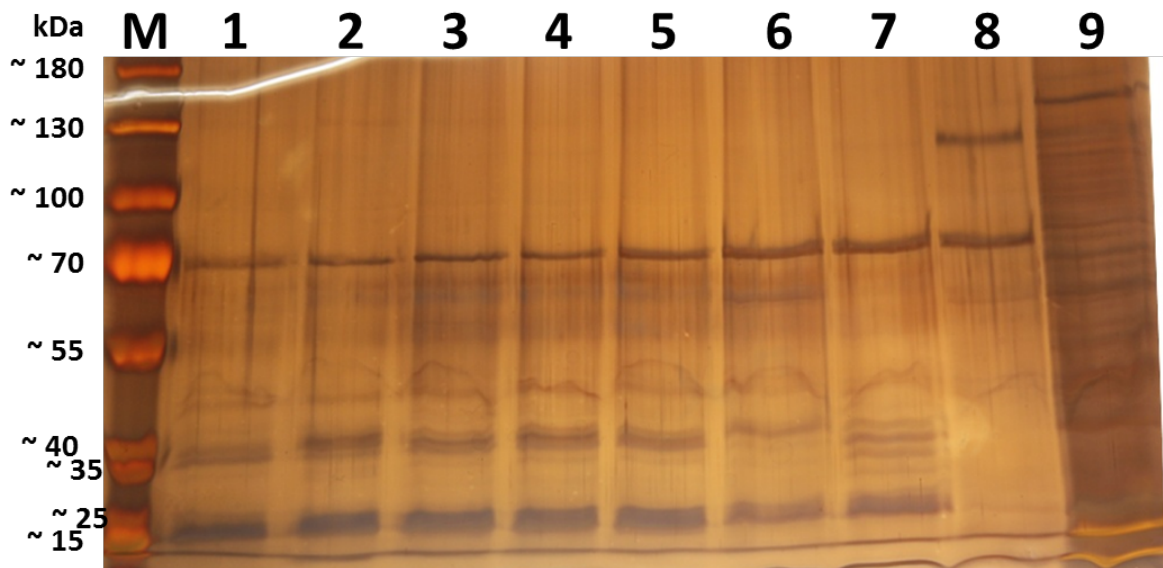
Für die Analyse des Proteinspektrums der Phagen wurden zunächst verschiedene Aufarbeitungen für die SDS-PAGE, sowie zwei unterschiedliche Proteinfärbungen hinsichtlich ihrer Sensitivität und Effizienz erprobt.

Im Rahmen dieser Arbeit stellte sich die Aufarbeitung der Ghostpartikel für die SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung als geeignetste Methode dar.

Die Visualisierung des Proteinspektrums der Bakteriophagen HB1, HB2, HB4, HB12, HB13, HB16, HB $\chi$  und HB-Wf wies weitestgehend Übereinstimmungen auf, wobei einige Proteinbanden im Bakteriophagen HB $\chi$  nicht nachgewiesen werden konnten, beziehungsweise deren Intensität wesentlich schwächer ausfiel als bei den übrigen Bakteriophagenisolaten. Zusätzliche Banden konnten bei den Bakteriophagen HB $\chi$  und HB-Wf detektiert werden. Im Rahmen der SDS-PAGE konnten fünf deutlich hervorstechende Proteinbanden beobachtet werden (Abbildung 18). Im Proteinspektrum des Bakteriophagen HB $\chi$  konnte ein Fragment mit einer Größe von ~130 kDa detektiert werden, welches in den übrigen Isolaten nicht beobachtet werden konnte. Als Referenz zur Auswertung der SDS-PAGE wurden die CDS-Produkte der Sequenzierung des Bakteriophagen HB10c2 herangezogen. Im Rahmen dieser Analyse konnte kein Produkt mit zugehöriger Masse ausgemacht werden. Ebenso verhielt es sich mit dem ~140 kDa Protein, welches sich lediglich im Bakteriophagen HB-Wf detektieren ließ. Ein Protein mit einer Größe von ~70 kDa konnte in allen aufgetrennten Proben nachgewiesen werden. Der Abgleich mit den Daten der Sequenzierung ließ hierbei auf die große Untereinheit des Terminase-Like Protein schließen (CDS HB\_00002). Die Masse der replikativen DNA-Helicase (CDS HB\_00044) korrelierte mit ihrer Gesamtmasse von ~51 kDa mit der schwach intensiven ~50 kDa-Bande, die sich mit schwacher Intensität in allen aufgetragenen Proben widerfinden ließ. Das Hauptkapsidprotein (CDS HB\_00005) mit einer Masse von ~41,7 kDa und das Rekombinationsprotein Bet (CDS HB\_00040) mit der zugehörigen Masse von ~35,0 kDa konnte in allen Isolaten außer HB $\chi$  wiederfinden. Ebenso verhielt es sich mit dem Haupt-Tail-Protein (CDS HB\_00011), welches sich durch seine molare Masse von ~15,9 kDa in allen Proben detektieren ließ.

Im Rahmen der SDS-PAGE-Versuche fiel auf, dass sich mit unterschiedlichen Aufarbeitungen der gleichen Phagenisolate keine identischen Proteinmuster resultierten. Lediglich die oben aufgeführten Proteine konnten durchgängig detektiert werden.





**Abbildung 18: SDS-PAGE der Phagen-Ghostpartikel nach Silberfärbung.** M, Marker; 1, Bakteriophage HB1; 2, Bakteriophage HB1; 3, Bakteriophage HB2; 4, Bakteriophage HB4; 5, Bakteriophage HB12; 6, Bakteriophage HB13; 7, Bakteriophage HB16; 8, Bakteriophage HB $\chi$ ; 9, Bakteriophage HB-Wf.

Die Ergebnisse der SDS-PAGE-Analysen zur Charakterisierung der Bakteriophagenisolate haben gezeigt, dass sich die Proteinspektren im Wesentlichen sehr ähneln, wobei die Bakteriophagen HB $\chi$  und HB-Wf sich durch fehlende, beziehungsweise zusätzliche Proteinbanden auszeichneten. Eine eindeutige Unterscheidung der Isolate war auf Grund der hohen Ähnlichkeit im Bandenmuster nicht möglich. Weiterhin konnte in den jeweiligen Wiederholungen gezeigt werden, dass die Art und Abundanz der Proteinbanden maßgeblich von den Kultivierungsbedingungen und Zeiten der Kultivierung abhängig ist.

Aus physiologischer Sicht konnte im Rahmen dieser Arbeit nur im Bereich der Proteinspektren Unterschiede zwischen den Bakteriophagenisolaten detektiert werden. Sowohl die Wirtsspezifität, als auch die Wurfzahl bildeten keine Möglichkeit der Differenzierung zwischen den vorliegenden Isolaten.

### 5.3.3 Eignung der Bakteriophagen als Therapeutikum

Durch die steigende Anzahl der antibiotikaresistenten Krankheitserreger steigt die Notwendigkeit alternativer Therapieverfahren im Bereich der bakteriell bedingten Infektionskrankheiten. Einen möglichen Ansatz hierzu stellt die Phagentherapie dar.

#### 5.3.3.1 Eignung des Bakteriophagen HB10c2

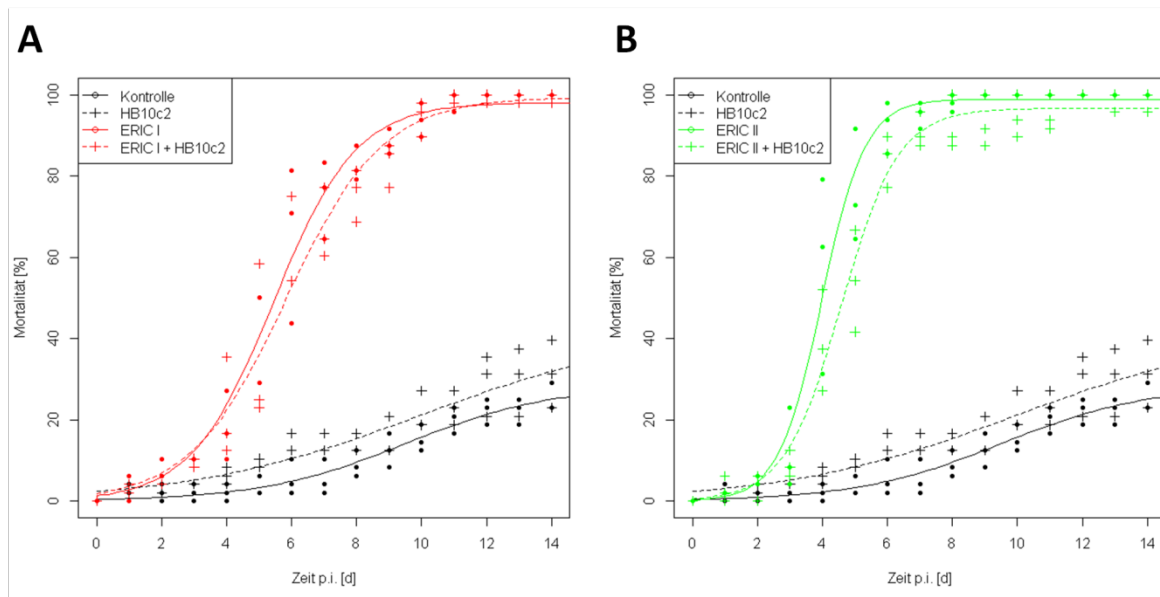
In den ersten Versuchen zur Isolation und Charakterisierung von *P. larvae*-spezifischen Bakteriophagen zeichnete sich der Phage HB10c2 durch seine lytische Wirkung gegenüber allen vier bis dahin bekannten Genotypen der AFB-Erregers sowie seine hohe Vermehrungsrate aus, daher wurde dieses Bakteriophagenisolat für initiale Versuche im Bereich der Phagentherapie zur Bekämpfung der AFB herangezogen.

In *in vivo*-Versuchen wurden L1-Larven von *A. mellifera* mit *P. larvae* infiziert. Zeitgleich wurden diese im Therapieversuch mit einer MOI = 100 des Bakteriophagen HB10c2 gefüttert. Als Kontrolle dienten uninfizierte Larven (Kontrolle der natürlichen Mortalität), infizierte Larven (Kontrolle der Mortalität durch Infektion der Larven mit *P. larvae*) und die Verabreichung des Bakteriophagen



HB10c2 an gesunde Larven (Kontrolle für die, durch den Bakteriophagen HB10c2 hervorgerufene Mortalität). Die Mortalität der Bienenbrut wurde über einen Zeitraum von 14 d dokumentiert (Abbildung 19). Abschließend wurden die Mortalitäten der drei Replikate statistisch ausgewertet.

Die Kontrollgruppe für die natürliche Mortalität wies nach 14 d eine Gesamtmortalität von  $25,00\% \pm 2,08$  auf. Aus der Applikation des Bakteriophagen HB10c2 an gesunde Larven resultierte nach 14 d eine Mortalität von  $31,25\% \pm 4,81$ . Die statistische Auswertung ergab, dass es sich hierbei um keinen signifikanten Unterschied handelte ( $p = 0,2992$ ). Die infizierten Individuen wiesen eine Gesamtmortalität von 100% nach 14 d auf, wobei die  $LT_{100}$ (ERIC I) 12 d nach der Infektion (p.i.) und die  $LT_{100}$ (ERIC II) 9 d p.i. erreicht wurde. Hierbei handelte es sich um einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle der natürlichen Mortalität ( $p = 3,56 \times 10^{-6}$ ). Der Mortalitätsverlauf der therapierten Individuen verlief um etwa 1 d verlangsamt, erreichte jedoch annähernd 100%. Die Therapie im Falle der Infektion mit dem Genotyp ERIC I resultierte in einer Gesamtmortalität von  $99,31\% \pm 0,69$ , bei ERIC II ergab sich eine Mortalität von  $98,61\% \pm 1,39$ . In beiden Fällen konnte kein signifikanter Unterschied zu den jeweilig infizierten Individuen festgestellt werden ( $p_{ERIC I} = 0,4226$  und  $p_{ERIC II} = 0,6770$ ).



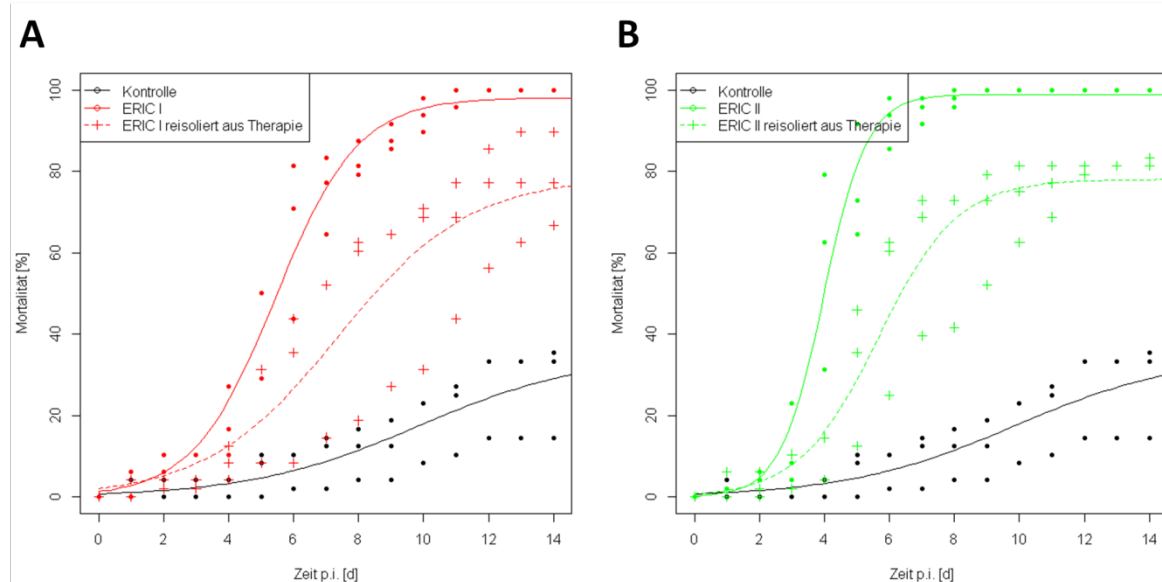
**Abbildung 19: Behandlung der mit *P. larvae* ERIC I (A), bzw. ERIC II (B) infizierten und mit dem Bakteriophagen HB10c2 therapierten Bienenlarven.** Infektion (500 Sporen/Larve) und Applikation des Bakteriophagen HB10c2 (50.000 pfu/Larve) erfolgten an d1 ( $t = 0$  d p.i.).

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass die Applikation des Bakteriophagen HB10c2 zeitgleich mit der Zugabe der Sporen an L1-Larven in einer MOI von 100 keinen therapeutischen Effekt bewirkt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Bakteriophage HB10c2 keinen negativen Einfluss auf die Mortalität der Individuen ausübt.

In anschließenden Versuchen wurden die therapierten Larven nach ihrem Tod homogenisiert und auf CNA ausplattiert. Hieraus resultierten Reinkulturen des entsprechenden *P. larvae*-Genotypen, der zur Sporulation gebracht wurde. Diese Sporen wurden zur Infektion einer weiteren Gruppe von L1-Larven verwendet (Abbildung 19).

Nach 14 d betrug die Mortalität der Kontrollgruppe  $27,78\% \pm 6,63$ . Dieser Wert unterschied sich nicht signifikant von der Kontrollmortalität des vorangegangenen Therapieversuches ( $p = 6,9 \times 10^{-1}$ ). Entsprechend wurden die Parameter der Infektion zum Vergleich aus dem vorherigen Versuch

herangezogen. Die Mortalität der Individuen, die an d1 mit 500 Sporen der reisolierten *P. larvae* infiziert wurden, betrug nach 14 d  $77,78\% \pm 6,63$  für ERIC I und  $81,94\% \pm 0,69$  für ERIC II. Die anschließende statistische Analyse zeigte, dass im Fall von ERIC I ein grenzwertig signifikanter Unterschied ( $p = 7,8 \times 10^{-2}$ ) im Vergleich zum Wildtyp vorlag. Für den Genotyp ERIC II konnte ein stark signifikanter Unterschied zur Mortalität des entsprechenden Wildtyps gezeigt werden ( $p = 1,5 \times 10^{-3}$ ).



**Abbildung 20: Infektion von *A. mellifera*-Larven mit reisolierten *P. larvae*-Sporen aus therapierter Bienenbrut mit dem Bakteriophagen HB10c2.** Die Infektion der Larven erfolgte mit den Genotypen ERIC I (A) und ERIC II (B) zu je 500 Sporen/Larve an d1 ( $t = 0$  d p.i.). Die Vergleichswerte zur Infektion stammen aus den vorangegangenen Therapieversuchen.

Durch die Infektion junger *A. mellifera*-Larven mit reisolierten Sporen konnte gezeigt werden, dass diese Infektionen weniger letal verliefen. Im Fall von ERIC I konnte die Mortalitätsrate um etwa 22% gesenkt werden. Die Differenz beim Genotyp ERIC II betrug circa 18%.

In der direkten Applikation des Bakteriophagen HB10c2 zeitgleich mit den Sporen des AFB-Erregers konnte kein therapeutischer Effekt festgestellt werden. Jedoch wiesen *P. larvae*-Sporen, die aus diesen therapierten Larven reisoliert wurden, eine verringerte Letalität auf.

### 5.3.3.2 Eignung des Bakteriophagen HB $\chi$ als Therapeutikum gegen die AFB

Die Versuche mit dem Bakteriophagen HB10c2 hatten bereits gezeigt, dass sich durch die singuläre Applikation des Bakteriophagen an infizierte *A. mellifera*-Larven eine Verlangsamung des Krankheitsverlaufes erreichen ließ. Die finale Mortalität blieb jedoch unverändert.

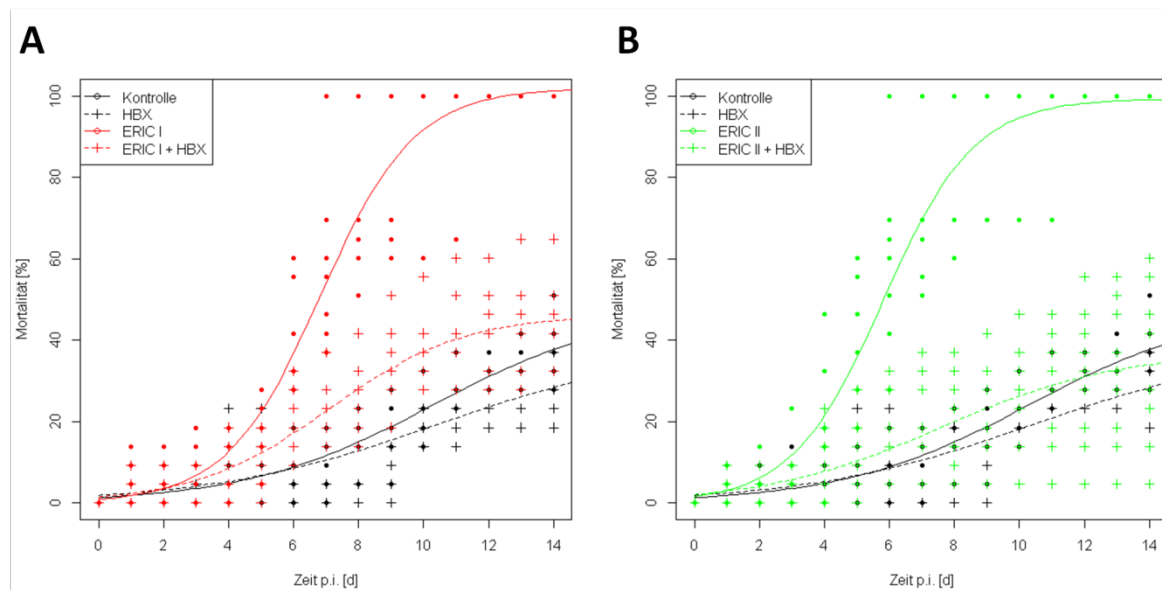
Im Rahmen der vorangegangenen Charakterisierungen wurde gezeigt, dass die zwei kritischen Markergene (N-acetylmuramoyl-L-alanin-Amidase und putative  $\beta$ -Lactamase) nicht im Genom des Bakteriophagen HB $\chi$  vorhanden sind.

Vor diesem Hintergrund wurde die Therapie mit dem Bakteriophagen HB $\chi$  modifiziert und durchgeführt. Hierzu wurden drei Replikate á 12 Larven aus je drei Völkern verwendet. Die Infektion der Larven erfolgte an d1 mit 500 Sporen des Genotyps ERIC I oder ERIC II von *P. larvae*. Die Verabreichung der Bakteriophagen erfolgte mit jeder Futtergabe ( $d_1$ ,  $d_3$ ,  $d_4$ ,  $d_5$  und  $d_6$ ). Zum Vergleich wurden die natürliche Sterblichkeit sowie die Verabreichung des Bakteriophagen an gesunde Larven und die entsprechenden Infektionen mitgeführt.

Die natürliche Mortalität der Individuen wies nach 14 d einen Wert von  $36,52\% \pm 2,37$  auf. Durch die chronische Applikation des Bakteriophagen HB $\chi$  an gesunde Larven konnte die Mortalität auf  $27,26\% \pm 1,80$  abgesenkt werden. Die Differenz zur Kontrolle in Höhe von  $9,26\%$  stellte sich als signifikant ( $p = 6,74 \times 10^{-3}$ ) dar. Die Infektion der L1-Larven mit *P. larvae* ergab sowohl für ERIC I als auch für ERIC II eine Gesamtmortalität von  $100\%$  und unterschied sich signifikant von der Kontrolle ( $p = 4,08 \times 10^{-9}$ ), und von der Phagenapplikation an gesunde Larven ( $p = 1,55 \times 10^{-10}$ ).

Bei der Therapie ließen sich hingegen bereits im Anstieg der Mortalitätsrate Unterschiede erkennen (Abbildung 21). So ähnelten sich beispielsweise der Kurvenverlauf der natürlichen Mortalität, der Phagenkontrolle und der beiden Therapieansätze. Die Therapie der mit ERIC I infizierten Bienenbrut resultierte nach 14 d in einer Gesamtmortalität von  $44,24\% \pm 3,28$  und unterschied sich damit signifikant von der zugehörigen Infektion ( $p = 1,47 \times 10^{-7}$ ). Ebenso stellte sich der Unterschied verglichen mit der finalen Mortalität der Phagenkontrolle dar ( $p = 3,40 \times 10^{-4}$ ). Der Unterschied zur natürlichen Mortalität stellte sich als signifikant dar ( $p = 7,49 \times 10^{-2}$ ).

Bei der Therapie der Infektion mit ERIC II betrug die finale Sterblichkeitsrate lediglich  $35,49\% \pm 6,36$  und unterschied sich ebenfalls signifikant von der entsprechenden Infektion ( $p = 7,66 \times 10^{-6}$ ). Die Unterschiede zur Kontrolle ( $p = 0,8825$ ), der Phagenfütterung ( $p = 0,2438$ ) und der Therapie des Genotypen ERIC I ( $p = 0,2397$ ) stellten sich als nicht signifikant dar.



**Abbildung 21: Behandlung der mit *P. larvae* ERIC I (A), bzw. ERIC II (B) infizierten und mit dem Bakteriophagen HB $\chi$  therapierten Bienenlarven.** Infektion (500 Sporen/Larve) an d<sub>1</sub> (t = 0 d p.i.) und Applikation des Bakteriophagen HB10c2 (50.000 pfu/Larve) an d<sub>1</sub>+d<sub>3</sub>-d<sub>5</sub>.

Durch die chronische Applikation des Bakteriophagen HB $\chi$  an infizierte *A. mellifera*-Larven konnte in diesen Versuchen gezeigt werden, dass im Falle von ERIC I die Mortalität nach 14 d um  $55,76\%$  abgesenkt werden konnte. Beim Genotyp ERIC II betrug diese Differenz  $64,51\%$ . Damit konnte ein therapeutischer Effekt dieses Bakteriophagen im Rahmen der Phagentherapie nachgewiesen werden.

## 6 Diskussion

### 6.1 Die Genotypen des Bienenpathogens *P. larvae*

*P. larvae* ist neben *M. plutonius* das einzige bakterielle Pathogen für *A. mellifera*. Bei *P. larvae* handelt es sich um ein reines Brutpathogen, das die Larve innerhalb der ersten 30 Lebensstunden durch die Aufnahme kontaminierten Futters infiziert (Genersch, 2010; Yue *et al.*, 2008).

#### 6.1.1 Verbreitung und relative Häufigkeit von *P. larvae*

Das globale Auftreten des Entomopathogens *P. larvae* (Morrissey *et al.*, 2015) konnte im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden. Hierbei konnte der Erreger der AFB sowohl in kommerziell erhältlichen Honig als auch in Proben aus kleineren Imkereien detektiert werden. Probenübergreifend konnten in 56,6% der Proben Sporen von *P. larvae* nachgewiesen werden. Hierbei unterscheiden sich die relativen Zahlen der Detektionen hinsichtlich der Kontinente. Honige amerikanischen Ursprungs (n=8) wiesen in 37,5% eine Belastung mit *P. larvae* auf, asiatische (n=8) hingegen nur in 25% der Fälle. Europäische Honige wiesen in 67,7% der Proben eine Belastung mit Sporen des Pathogens auf. In der australischen Probe konnten ebenfalls Sporen nachgewiesen werden. Die Proben (n=3), deren geografische Herkunft („EG- und Nicht-EG-Länder“) nicht festgestellt werden konnte, wiesen ebenfalls in allen Proben Sporen von *P. larvae* auf. Dahingegen konnte *P. larvae* in afrikanischen Proben nicht detektiert werden. Die Auswertung der Ergebnisse hat gezeigt, dass *P. larvae* sich in Proben aus vier von fünf Kontinenten, auf denen Bienenhaltung betrieben wird, nachweisen lässt. Diese Schlussfolgerung deckt sich mit Literaturwerten (Morrissey *et al.*, 2015). Diese Stichprobe setzt sich heterogen aus zufällig ausgewählten Proben der fünf Kontinente zusammen. Auf Grund der niedrigen Probenzahl aus Afrika und Australien sind diese Werte relativ betrachtet keine Darstellung der tatsächlichen Verbreitung von *P. larvae* auf diesen Kontinenten. Um statistisch zuverlässige Daten zu generieren, wären homogene Stichproben mit gleicher Zusammensetzung an kommerziell erzeugten Honigen, wie auch aus kleineren Imkereien nötig, wie auch eine höhere Probenzahl.

Nichtsdestotrotz zeigen die Ergebnisse eine globale Verbreitung des Erregers auf, wie sie bereits in zahlreichen Studien vorab postuliert wurde (Genersch, 2010; Morrissey *et al.*, 2015). Bei einem größeren Probenvolumen und einer höheren Homogenität der imkerlichen Betriebsweisen und Betriebsgrößen wäre davon auszugehen, dass in Staaten mit legitimer Antibiotikaapplikation an Honigbienen die Anzahl der *P. larvae*-Detektionen höher ist als in solchen, in denen diese untersagt ist (Tian *et al.*, 2012). Durch Antibiotikaapplikation werden lediglich vegetative Zellen von *P. larvae* beeinflusst, die Spore hingegen nicht. So lassen sich in diesen Völkern keine Symptome der AFB und damit verbunden auch keine Schädigungen erkennen, jedoch lassen sich die Sporen im Volk und Honig finden. Somit wird die AFB durch Antibiotika lediglich maskiert. Eine weitere Produktion von Sporen wird zwar hierdurch verhindert, da jedoch eine sehr geringe Sporenzahl für eine erfolgreiche Infektion pro Larve benötigt wird (Yue *et al.*, 2008), kann von keiner Heilung durch die Antibiotikaapplikation ausgegangen werden. Weiterhin können sich gesunde Völker durch Räuberei und Materialaustausch an augenscheinlich gesunden, „maskierten“ Völkern mit *P. larvae* infizieren. Dadurch wird wiederum die Verbreitung der AFB gefördert. In Europa werden andere Betriebsweisen angewandt, in denen die AFB im Regelfall über Sanierungsmaßnahmen bekämpft wird (Kettner *et al.*, 1988; Tian *et al.*, 2012; Weiß, 2003). Dadurch wird der Verbreitung der AFB entgegengewirkt (Genersch, 2010; von der Ohe, 2001; von der Ohe, W., 2003; von der Ohe, 2016b).

### 6.1.2 Verbreitung der Genotypen von *P. larvae*

Anhand der Ergebnisse der repPCR unter Verwendung von ERIC Primern konnten die isolierten Stämme von *P. larvae* (n=30) den Genotypen (ERICs) zugeordnet werden (Genersch *et al.*, 2006). In 66,7% der Isolate lag der Genotyp ERIC I vor, der nach Literaturangaben den Großteil der AFB-Ausbrüche weltweit hervorruft (Genersch, 2010; Morrissey *et al.*, 2015). Der auf Individuenebene virulentere Genotyp ERIC II konnte in 30% der Isolate nachgewiesen werden. Bei der Verteilung der Genotypen ERIC I und II fiel auf, dass sich ERIC I weltweit nachweisen ließ, wohingegen Isolate des virulenteren Genotyps (ERIC II) nur auf dem Europäischen und dem amerikanischen Kontinent detektiert werden konnten. Hinzu kommen Honige aus „EG- und Nicht-EG-Ländern“. Bei letzteren ist jedoch anzunehmen, dass sie sich zu einem Großteil aus Honigen amerikanischen Ursprungs zusammensetzen. Die seltenen Genotypen ERIC III und IV konnten hingegen im Rahmen dieser Arbeit in keiner Probe nachgewiesen werden. Abweichend zu den bekannten Mustern der Amplifikate aus der repPCR zur Genotypisierung von *P. larvae* konnte bei der Analyse des Isolates 138b ein Bandenmuster beschrieben werden, das dem von ERIC II ähnelt, jedoch ein weiteres Produkt in einer Größe von circa 1.250 bp aufweist. Dieses Isolat repräsentiert den potentiell neuen Genotyp ERIC V.

### 6.1.3 Charakterisierung der Genotypen ERIC I-V von *P. larvae*

In Folge der Auffälligkeiten in der repPCR wurden die verschiedenen Genotypen von *P. larvae* hinsichtlich ihrer Physiologie und Morphologie untersucht. Ein morphologisch auffälliges Kriterium stellt die Oberflächenstruktur der Endospore dar (Genersch *et al.*, 2006). Die Oberflächen der Sporen der Genotypen ERIC I (DSM 7030) und ERIC II (DSM 25430) weisen eine glatte Oberfläche auf, wobei die Sporen von ERIC II einige Einwölbungen aufwiesen. Die selteneren Genotypen ERIC III-V (ERIC III, LMG 16252; ERIC IV, LMG 16247; ERIC V, DSM 106052) zeigen hingegen Längsriefen auf der Sporenoberfläche, die längs auf der Oberfläche von einem Pol der Spore zum anderen verlaufen. Aus morphologisch-systematischer Sicht weisen die selteneren Genotypen (ERIC III-V) eine Synapomorphie im Bereich der Oberflächenstruktur der Spore auf. Die vegetativen Zellen wiesen keine erkennbaren morphologischen Unterschiede auf. Während der Kultivierung von *P. larvae* auf CSA ließen sich jedoch physiologische Unterschiede erkennen. Nach einer Inkubation von 24 h bei 30 °C zeigt der Genotyp ERIC I (DSM 7030) eine schwache  $\beta$ -hämolytische Wirkung auf. ERIC III-V wiesen eine starke  $\beta$ -hämolytische Wirkung auf, wohingegen bei ERIC II diese Eigenschaft nicht beobachtet werden konnte. Die Genotypen mit starker  $\beta$ -hämolytische Wirkung zeichneten sich zudem durch eine schnell einsetzende Sporulation auf CSA aus. Die Genotypen ERIC I und II benötigten hierfür entscheidend länger. Folglich stellt die Befähigung zur starken  $\beta$ -Hämolyse auf CSA bei 30 °C nach 24 h eine weitere Synapomorphie der Genotypen ERIC III-V dar. Weitere Unterschiede zwischen den Genotypen ließen sich bei der Kultivierung auf Columbia-Agar feststellen. Die Genotypen ERIC II-IV waren dabei in der Lage orange pigmentierte Kolonien zu bilden, wohingegen ERIC I lediglich graue Kolonien aufwies. Auf der Basis dieser Pigmentierung lässt sich die ursprüngliche Differenzierung in verschiedene Erreger erklären (Ash, C. *et al.*, 1991; Genersch *et al.*, 2006; Katznelson, H., 1950). Durch DNA-basierte Verfahren (repPCR) (Genersch *et al.*, 2006) wurde diese Klassifizierung der späteren Subspezies *pulvificiens* und *larvae* aufgehoben und die Unterteilung in ERICs vorgenommen. Hierbei lässt sich der Originalstudie entnehmen (Genersch *et al.*, 2006), dass die frühere Subspezies *larvae* den Genotyp ERIC I repräsentiert. Die Genotypen ERIC III und IV clustern ausschließlich in der ehemaligen Subspezies *pulvificiens*. Dahingegen lässt sich der Genotyp ERIC II in beiden ehemaligen Subspezies wiederfinden (Genersch *et al.*, 2006).

#### 6.1.4 Vergleich der Virulenz der Genotypen ERIC I-V von *P. larvae*

FISH-Studien zum Ablauf der Pathogenese der AFB zeigten, dass bereits 24 h nach der Infektion mit *P. larvae*-Sporen vegetative Zellen im Mitteldarm der infizierten Larve detektiert werden können (Yue *et al.*, 2008). Während der sich anschließenden massiven Proliferation des Erregers im Mitteldarm lassen sich sowohl Sporen als auch vegetative Zellen nachweisen. Das Verhältnis zwischen vegetativen Zellen und Überdauerungsformen verschiebt sich im Rahmen der Pathogenese von der Proliferation in der noch lebenden Larve über den Faulbrutschleim (abgestorbenes Individuum) bis hin zum Faulbrutschorf (Überreste der Brut), wobei der AFB-Schorf im Wesentlichen nur noch aus den Sporen des Erregers besteht (Yue *et al.*, 2008). Diese Sporen bilden wiederum den Ausgangspunkt für weitere Infektionen im Bienenvolk (Genersch, 2010). Bedingt durch das Verhältnis zwischen Sporen und vegetativen Zellen im zeitlichen Ablauf der Infektion mit *P. larvae* liegt die Schlussfolgerung nahe, dass der Genotyp ERIC I die effektivste Adaption an seinen Wirt aufweist. Für den Genotyp ERIC I (DSM 7030) von *P. larvae* ist die  $LT_{100}$  mit ~12 d p.i. beschrieben (Genersch *et al.*, 2006). Dieser Wert konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Infizierte Individuen sterben somit gegen Ende des Puppenstadiums und werden verhältnismäßig selten von den Ammen als tot erkannt. Infolgedessen kann das Entomopathogen die tote Brut komplett zu einem Faulbrutschleim zersetzen, bevor die Brut von den Stockbienen als tot erkannt und ausgeräumt wird, womit die Verteilung der Sporen im Stock einhergeht.

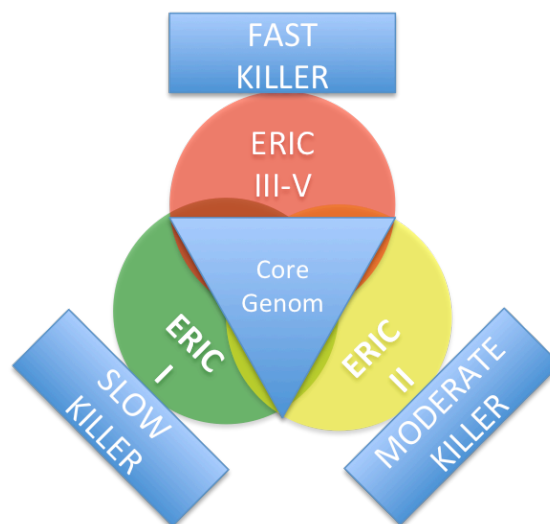
Die auf Individuenebene virulenteren Genotypen (ERIC II-IV) erreichen die  $LT_{100}$  nach Literaturangaben bereits nach etwa sieben Tagen (Genersch *et al.*, 2005, 2006). Die entsprechenden Genotypen weisen zwar somit eine höhere Virulenz auf, jedoch steht ihnen nach dem Tod des Wirtes im späten Larven-, beziehungsweise frühen Puppenstadium weniger Nährmedium für ihre eigene Vermehrung zu Verfügung. Hinzu kommt, dass die Ammen die erkrankten Individuen häufiger auf Grund ihres abnormen Verhaltens erkennen und ausräumen, wodurch die Reproduktion weiterer Larveninfektionen eingeschränkt wird.

Die Ergebnisse zur Virulenz der Genotypen ERIC II-V (ERIC II, DSM 25430; ERIC III, LMG 16252; ERIC IV, LMG 16247; ERIC V, DSM 106052) haben gezeigt, dass sich die  $LT_{100}$  der virulenten Genotypen untereinander ebenfalls unterscheidet. So konnte für ERIC II die  $LT_{100}$  von ~7 d p.i. (Genersch *et al.*, 2005) bestätigt werden. In Zusammenhang mit den vorangegangenen Überlegungen zur Virulenz mit der  $LT_{100}$  und den daraus resultierenden Neuinfektionen erklärt sich die geringere Abundanz des Genotypen ERIC II.

Entgegen den Literaturwerten (Genersch *et al.*, 2006) erreichten die hochvirulenten Genotypen ERIC III-V die  $LT_{100}$  bereits ~2 d p.i.. Somit wurde der Wirt bereits im Larvenstadium abgetötet, in dem sich die Brut noch in der offenen Zelle befindet und für die Ammen frei zugänglich ist. Diese können folglich das asymptomatische Verhalten erkrankter Brut sehr schnell feststellen und tote Larven zeitnah über das Hygieneverhalten entfernen. Folglich weisen die Genotypen ERIC III-V eine verhältnismäßig geringe Reproduktionsrate im Rahmen der Infektion auf, wodurch sich das seltene Auftreten dieser Genotypen erklären ließe. Allerdings konnte bei der Kultivierung der hochvirulenten Genotypen ERIC III-V auf CSA beobachtet werden, dass diese bereits nach drei Tagen, also deutlich früher als die Genotypen ERIC I und II mit der Sporulation beginnen. Weiterhin stellt sich die mögliche Art der Sporenverbreitung innerhalb des Bienenvolkes als unterschiedlich effektiv dar. Die Genotypen ERIC I und II haben in aller Regel die Möglichkeit die Larve zum typischen AFB-Schleim zu zersetzen, der sich in der unteren Rinne der betroffenen Brutzelle ausbreitet und dort zum AFB-Schorf eintrocknet, welcher wiederum aus den Sporen von *P. larvae* besteht. Nach dem Öffnen der betroffenen Brutzelle beginnen die Ammen mit dem Ausräumen der entsprechenden Zelle. Dabei nehmen sie einerseits die Sporen des Erregers oral auf, andererseits überlaufen sie die Sporen. Ein Teil der oral aufgenommenen Sporen wird verdaut, ein weiterer Teil bleibt an den Mundwerkzeugen haften und wird auf diese Weise weiterverbreitet. Zudem werden die an den Füßen anhaftenden Sporen im

Bienenvolk verteilt. Bei Infektionen mit den hochvirulenten Genotypen ERIC III-V wird die Larve im sogenannten Rundlarvenstadium getötet. Zu diesem Zeitpunkt befindet sich die Larve am Boden der Zelle, sodass ein Belaufen des kontaminierten Materials und die daraus resultierende Sporenverbreitung im Volk weitestgehend ausbleiben. Hinzu kommt, dass zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung keine Verbindung zwischen Mittel- und Enddarm der Larve besteht und sporenhaltige Fäkalien, sowie AFB-Schleim und –Schorf nicht in den betroffenen Brutzellen vorkommen (Genersch, 2010; Kettner *et al.*, 1988; Yue *et al.*, 2008). Vor diesen Hintergründen lässt sich über folgende Möglichkeit zur Kompensierung dieses virulenzbedingten Nachteils hinsichtlich der reproduktiven Fitness der Genotypen ERIC III-V spekulieren: Durch die FISH-Analysen (Yue *et al.*, 2008) konnte gezeigt werden, dass sich die Sporen nach der Aufnahme am Mitteldarmepithel anlagern und dort auskeimen. Die Riefen auf der Sporenoberfläche könnten somit als Teil der Oberflächenvergrößerung zur Anlagerung an das Mitteldarmepithel fungieren. Hinzu kommt, dass diese Strukturen ein Ablösen der Sporen vom Mitteldarmepithel durch die Kontraktionen des Mitteldarms kompensieren könnten. Weiterhin wird diese These zur Kompensierung durch die schnell einsetzende Sporulation der Genotypen ERIC III-V auf CSA gestützt. Daraus lässt sich die These entwickeln, dass die virulenteren Genotypen auf Grund der schnellen Detektion infizierter Larven durch Ammenbienen wesentlich früher mit der Sporulation beginnen müssen, um zu einem früheren Zeitpunkt Sporen in größerer Zahl produzieren zu können. Diese Sporen bilden die Grundlage für weitere Infektionen und damit das Überleben des Entomopathogens im infizierten Bienenvolk.

Abschließend lassen sich die fünf beschriebenen Genotypen von *P. larvae* in drei unterschiedlich virulente Gruppen einordnen (**Abbildung 22**). Der Genotyp ERIC I repräsentiert hierbei den „Slow Killer“, der das klassische Erscheinungsbild der AFB hervorruft. ERIC I weist eine hohe Effizienz auf der Volksebene auf, hingegen eine geringere auf der Individualebene. ERIC II stellt den aggressiveren der beiden aktuell vorkommenden Genotypen dar und ist ein „Moderate Killer“. Auf Individualebene ist ERIC II deutlich erfolgreicher als ERIC I, jedoch ist er dadurch auf der Volksebene weniger effizient. ERIC III-V hingegen repräsentieren die „Fast Killer“, die infizierte Individuen rasant abtöten und sich dadurch die Vermehrungsgrundlage im Volk nehmen und daher auf Volksebene weniger virulent erscheinen.



**Abbildung 22:** Gegenüberstellung der drei Killertypen von *P. larvae*. Slow Killer, ERIC I; Moderate Killer, ERIC II; Fast Killer, ERIC III-V.

### 6.1.5 Virulenzfaktoren von *P. larvae*

Die bereits beschriebene unterschiedliche Virulenz der Genotypen von *P. larvae* kann auf verschiedenen Faktoren basieren. Einen wesentlichen Aspekt der Virulenz stellen die sogenannten Virulenzfaktoren dar. In *P. larvae* sind bereits erste Virulenzfaktoren wie bestimmte Enzyme (Garcia-Gonzalez *et al.*, 2014b) und Toxine (Fünfhaus *et al.*, 2013) beschrieben. Ebenso können

Sekundärmetabolite, welche aus nicht-ribosomal produzierten Peptiden (NRPs) bestehen, Virulenzfaktoren darstellen. Die Genomanalyse der Genotypen ERIC I und II konnte zeigen, dass in *P. larvae* vier Gencluster für NRPs vorliegen (Djukic *et al.*, 2014b). Hierbei handelt es sich um die NRPs Bacillibactin (Hertlein *et al.*, 2014), Sevadecin (Garcia-Gonzalez *et al.*, 2014a), Paenilamicin (Müller *et al.*, 2014) und Paenilarvin (Sood *et al.*, 2014). Die funktionsfähigen NRPs konnten jedoch gemäß der Publikationen nur von dem virulenteren Genotyp ERIC II (DSM 25430) synthetisiert werden. Durch die *de novo* Synthese der Gesamtgenome von *P. larvae* ERIC III-V konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die erhöhte Virulenz dieser Genotypen nicht durch NRPs bedingt wird, da keine weiteren Gencluster für entsprechende Sekundärmetabolite detektiert werden konnten. Jedoch konnte gezeigt werden, dass der Genotyp ERIC V über das gesamte Spektrum der fünf NRPS-Cluster verfügt, wohin gegen die Cluster für Paenilarvin und Sevadecin in ERIC III und IV fehlen. Die entsprechenden Arbeiten über die NRPs Bacillibactin, Paenilamicin und Sevadecin haben bereits gezeigt, dass entsprechende Knock-Out-Mutanten keine signifikanten Veränderungen in ihrer Virulenz gegenüber *A. mellifera* aufweisen, somit handelt es sich bei diesen NRPs nicht um primäre Virulenzfaktoren. Jedoch konnte durch Koinfektionen der Larven mit *P. alvei* und den entsprechenden Mutanten von *P. larvae* gezeigt werden, dass *P. alvei* sich in *A. mellifera* erfolgreich behaupten konnte. Dieses Phänomen lässt sich bei der entsprechenden Koinfektion mit dem Wildtyp nicht beobachten. Somit stellen diese drei NRPs Fitnessfaktoren dar, die es *P. larvae* ermöglichen, seine ökologische Nische im Mitteldarm von *A. mellifera* zu schaffen (Garcia-Gonzalez *et al.*, 2014a; Hertlein *et al.*, 2014; Müller *et al.*, 2014).

### 6.1.6 Paenilarvin als potentieller Virulenzfaktor von *P. larvae*

Paenilarvin zählt zu den Lipopeptiden aus der Familie der Iturine und wird nicht-ribosomal von *P. larvae* produziert (Djukic *et al.*, 2014b; Sood *et al.*, 2014). Obwohl die *in silico*-Analyse im Genom von ERIC III (LMG 16252) kein entsprechendes Gencluster für Paenilarvin erbrachte, konnten hier die Gene *ItuD*, *ItuA*, *ItuB* und *ItuC* mittels PCR nachgewiesen werden. Eine mögliche Begründung könnte die Translokation der betreffenden Gene aus dem Cluster heraus liefern. Das entsprechende Cluster ist bereits in *B. subtilis* bekannt und beschrieben (Djukic *et al.*, 2014b). Ein wichtiges Indiz hierfür stellen die flankierenden Gene des entsprechenden Paenilarvin-Clusters in *P. larvae* ERIC II (DSM 25430) dar. So finden sich unter GenBank Accession-Nummer CP00335.1 upstream des Clusters zwei Transposasen (*ERIC2\_c18850* und *ERIC2\_c18840*), sowie ein Transposon (*tnp114*), downstream lassen sich hingegen eine Transposase (*ERIC2\_c18740*) und eine Transposon-Insertion (*insK9*) finden. Ferner ist auch eine Translokation durch Transduktion in Erwägung zu ziehen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass ein Großteil der *P. larvae*-spezifischen Bakteriophagen lysogene Eigenschaften aufweisen und daher potentiell in der Lage sind den Wirt zu transduzieren. Explizit war zwar keiner der analysierten Bakteriophagen in der Lage *B. subtilis* als Wirt zu nutzen, jedoch konnte *B. brevis* als potentieller Wirt aller untersuchten Bakteriophagen identifiziert werden. Vor dem Hintergrund, dass das Gramicidin-S-Synthase-Cluster, ebenfalls ein NRPS-Cluster, aus *B. brevis*, im Genom von ERIC I und II detektiert werden kann (Djukic *et al.*, 2014b) stellt sich diese Hypothese als durchaus möglich dar.

Im Gegensatz zur *in silico*-Analyse auf der Grundlage von Genomsequenzen konnten *in vitro* mittels HPLC-UV-MS nur zwei der vier NRPs detektiert werden. Hierbei war eine eindeutige Identifikation nur für Paenilarvin möglich. Die Genotypen ERIC II, III und V waren in der Lage die Paenilarvine A und B zu synthetisieren, zusätzlich konnte Paenilarvin C von ERIC V produziert werden. Unter Laborbedingungen konnten *in vivo* die Paenilarvine A und C für ERIC II und ERIC V identifiziert werden, zudem war ERIC V in der Lage Paenilarvin B zu produzieren. Eine Analyse der Genotypen ERIC III und IV wurde auf Grund der geringen weltweiten Abundanz nicht durchgeführt.



Abschließend konnten in Umweltproben zersetzter *A. mellifera*-Larven bei einer Infektion mit ERIC II die Paenilarvine A-C nachgewiesen werden. Somit stellen die Paenilarvine die einzigen NRPs dar, die neben der *in silico*-Detektion auch *in vitro* und vor allem aber *in vivo* nachgewiesen werden konnten. Dabei fällt auf, dass dieses lediglich durch die aktuell auftretenden Genotypen ERIC II und V geschieht. Hierbei handelt es sich um die beiden, auf Individuenebene, hochvirulenteren Genotypen. Daher liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei den Paenilarvinen um Fitnessfaktoren handelt.

Über die orale Verabreichung der Paenilarvine an *A. mellifera*-Larven konnte jedoch keine signifikante biologische Aktivität für Paenilarvin B und C gezeigt werden. Zur finalen Analyse der Paenilarvine als potentielle Fitnessfaktoren steht die Erstellung und Analyse einer  $\Delta ItuD$ -Mutante noch aus. Im Rahmen dieser Arbeit konnte dieser Teilaspekt jedoch nicht beendet werden. Nach dem Ende der praktischen Arbeiten dieser Studie konnte die Rolle der Paenilarvine als Virulenzfaktor allerdings nicht bestätigt werden (Hertlein *et al.*, 2016).

Mit diesen Überlegungen kann das seltene Auftreten und die damit verbundene Detektion der Genotypen ERIC III-V interpretiert werden. Diese Erregervarianten wiesen eine deutlich erhöhte Pathogenität und Virulenz gegenüber ihrem Wirt *A. mellifera* auf Individuenebene auf, wodurch sie diesen innerhalb kurzer Zeit letal schädigen und damit ihre ökologische Nische nur für einen geringeren Zeitraum nutzen können. Dadurch wäre ihre Reproduktionsrate reduziert, woraus hinsichtlich der reproduktiven Fitness ein selektiver Nachteil gegenüber den Genotypen ERIC I und II entstünde.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Isolat 138b als neuer Genotyp (ERIC V) von *P. larvae* identifiziert und beschrieben werden konnte (DSM 106052). Dieser Genotyp weist sowohl Eigenschaften der hochvirulenten Genotypen ERIC III und IV auf, als auch der weniger virulenten Genotypen ERIC I und II. Die Virulenz auf Individuenebene des Genotypen ERIC V, die Sporenmorphologie und die  $LT_{100}$  ähneln den Eigenschaften der Genotypen ERIC III und IV. Die Produktion der NRPs im Rahmen der Infektion von *A. mellifera* und das resultierende Bandenmuster im Rahmen der repPCR unter Verwendung von ERIC-Primern ähneln hingegen den Eigenschaften der Genotypen ERIC I und II.

## 6.2 Trcs und ihre Wirkung in *A. mellifera*

Bei Trcs handelt es sich um cyclische Dekapeptide, die von *B. aneurinolyticus* produziert und sezerniert werden. In vorherigen Studien konnte bereits eine biologische Aktivität dieser Substanzen gegenüber Pilzen und Gram-positiven Bakterien nachgewiesen werden (Leussa and Rautenbach, 2014; Spathelf and Rautenbach, 2009; Troskie *et al.*, 2014b).

### 6.2.1 Wirkung der Trcs auf das Mikrobiom von *A. mellifera*

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die biologischen Effekte dieser Dekapeptide auf das Mikrobiom von *A. mellifera*, sowie den Gram-positiven Entomopathogenen *P. larvae*, *M. plutonius* und den kommensalen Erregern der EFB untersucht.

Die Versuche haben dabei gezeigt, dass die MHK von T<sub>E</sub> gegenüber der Gram-positiven Mikrobiota um den Faktor 9 und für Gram-negative 11 Mal höher liegt als die MHK von T<sub>E</sub> gegenüber der Bienenpathogene. Ferner liegen die Differenzen der Mittelwerte der MHK der Mikrobiota, sowohl in der Gesamtbetrachtung, als auch bezogen auf das jeweilige Gram-Verhalten abzüglich des jeweiligen SEM noch immer oberhalb Summer aus der MHK der Pathogene und deren SEM, bzw. den analogen Daten zu *P. larvae* und *M. plutonius* mit seinen Kommensalen.

Auf der Grundlage dieser Werte kann davon ausgegangen werden, dass die MHK gegenüber dem Mikrobiom und die MHK gegenüber den Entomopathogenen sich nicht überlagern. Ferner wiesen alle untersuchten Stämme der Pathogene, insbesondere von *P. larvae*, eine Sensitivität gegenüber T<sub>E</sub> auf. Damit ist die ökologische Absicherung des Wirkstoffes T<sub>E</sub> gegenüber dem Mikrobiom gezeigt, hierbei ist jedoch zu beachten, dass die getesteten Vertreter des bakteriellen Mikrobioms nur einen artifiziellen Anteil der kultivierbaren Vertreter des Mikrobioms abdecken (Mohr and Tebbe, 2006, 2007). Neben den mikrobiellen Symbionten von *A. mellifera* gilt es ebenfalls die pilzlichen Vertreter zu beachten; so konnte für die verwendete Gruppe der Dekapeptide eine starke biologische Aktivität gegenüber Pilzen nachgewiesen werden (Troskie *et al.*, 2014b). Daher stehen entsprechende Versuche hinsichtlich der MHK-Bestimmung des T<sub>E</sub> gegenüber dem Mycobiom von *A. mellifera* noch aus. Abhängig von den Ergebnissen dieser Untersuchungen müssten weitere Analysen zu den daraus resultierenden und anwendbaren Dosen vor dem Hintergrund der MHK der Pathogene und des Wirkspektrums durchgeführt werden. Nichtsdestotrotz konnte gezeigt werden, dass eine potentielle therapeutische Wirkung gegenüber den Entomopathogenen *in vitro* vorhanden ist.

### 6.2.2 Wirkung der Trcs auf Larven von *A. mellifera*

Auf der Grundlage dieser *in vitro*-Ergebnisse wurden weitere Versuche in *A. mellifera*-Larven durchgeführt. Die Kriterien zur Auswertung der Versuche nach OECD/OCD 237 wurden durch die Ergebnisse der Kontrollen erfüllt. Neben T<sub>E</sub> wurden weiterhin die Effekte von T<sub>Mix</sub> auf die Larven getestet. Diese Versuche ergaben, dass ab einer Dosis von 1,83 µg/Larve für T<sub>E</sub>, beziehungsweise 0,61 µg/Larve für T<sub>Mix</sub> keine negativen Auswirkungen auf die Bienenbrut erkennbar waren. Somit wiesen die Larven eine höhere Sensitivität gegenüber T<sub>Mix</sub> auf.

Diese höhere Empfindlichkeit lässt sich darauf zurückführen, dass das T<sub>Mix</sub> eine nicht definierte Mischung verschiedener Dekapeptide und deren Nebenprodukten darstellt, deren Wirkung nicht explizit auf einen Bestandteil zurückgeführt werden kann. Das T<sub>E</sub> hingegen stellt einen Extrakt dar, der das Tyrothricin repräsentiert. Daher kann in diesem Falle der Wert der MHK und der nicht schädlichen Dosis gegenüber Bienenlarven direkt auf dieses einzelne Peptid zurückgeführt werden. Im T<sub>Mix</sub> befinden sich neben dem Tyrothricin auch weitere Dekapeptide, welche von *B. aneurinolyticus* produziert werden.

Vergleicht man diese Werte mit den MHK aus dem vorherigen Versuch lassen sich daraus folgende Schlüsse ziehen: Unter der Annahme, dass das Volumen einer Larve an d<sub>7</sub> näherungsweise 200 µL beträgt und die Trcs von d<sub>4</sub> in Gänze aufgenommen und nicht abgebaut wurden, resultiert hieraus eine Dosis von 9,15 µg/mL für T<sub>E</sub> und 3,05 µg/mL für T<sub>Mix</sub>. Für T<sub>E</sub> liegen Vergleichswerte in Form der MHK gegenüber dem Mikrobiom vor. Basierend auf dem vorherigen Diskussionsansatz deckt die Dosis von 9,15 µg/mL die MHK der Pathogene ab, somit wäre eine biologische Aktivität innerhalb eines Wirkspektrums gegenüber den Entomopathogenen gegeben, durch welches der Wirt im Larvenstadium nicht geschädigt wird. Folglich stellen die Trcs ein potentiell neues, hochwirksames Fungizid im Bereich der Agrarwirtschaft dar, das in den applikationsüblichen Dosen im Rahmen der Landwirtschaft keine negativen Auswirkungen auf die Larvalentwicklung der Honigbiene erwarten lässt (Vosloo *et al.*, 2017). Ebenfalls konnte in vorherigen Versuchen an der Universität Stellenbosch bereits gezeigt werden, dass adulte Bienen von *A. mellifera* subsp. *scutellata* in Bereich dieser Dosierungen ebenfalls keine negativen Veränderungen in Physiologie oder Mortalität aufweisen (Vosloo *et al.*, 2015).

Vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse gilt es jedoch zu beachten, dass der verwendete Test und die damit verbundene OECD/OCD Richtlinie 237 lediglich das Larvenstadium von *A. mellifera* betrachten. Der Test endet an d<sub>7</sub> mit dem Ende des Larvenstadiums. An diesem Zeitpunkt richtet sich die Larve in der Zelle auf und wird zur Vorpuppe (sog. Streckmade). Mit diesem Teil der Metamorphose geht die Verbindung des Mittel- und Enddarms einher. Nur so kann es zur zwingend notwendigen Defekalierung kommen, bevor die Larve in das Vorpuppenstadium übergeht. Vorangegangene Versuche von Johan Arnold Vosloo (Stellenbosch University, South Africa) hatten gezeigt, dass hohe Dosierungen der Trcs bei adulten Bienen physiologische Schädigungen induzieren, die speziell im Bereich des Verdauungstraktes. Basierend auf dieser Immobilisierung führten hohe Dosen der Trcs zum Tod der Imago. Die Immobilisierung des Verdauungstraktes könnte daher einen Teil der Metamorphose am Übergang vom Larven- zum Puppenstadium stören. Die gegenwärtig angewandten Methoden decken dieses Stadium jedoch nicht ab. Daher kann aus den durchgeführten Versuchen noch keine Aussage dahingehend getroffen werden, in wieweit die Trcs eine negative Auswirkung auf die weitere Entwicklung haben.

### 6.2.3 Trcs als potentielles Therapeutikum der AFB

Aus den Ergebnissen der beiden vorangegangenen Versuche geht hervor, dass die Trcs eine hohe biologische Aktivität gegenüber den Entomopathogenen *M. plutonius* und *P. larvae* von *A. mellifera* aufweisen. Die Sensitivität dieser Bakterien liegt hierbei unterhalb der Sensitivität von *A. mellifera*. Ferner weist die Mikrobiota der Honigbiene (Mohr and Tebbe, 2006, 2007) eine höhere Toleranz gegenüber diesen Wirkstoffen auf. Auf Grund dieser Eigenschaften wurde die therapeutische Wirkung von T<sub>E</sub> und T<sub>Mix</sub> auf *P. larvae* im Rahmen von *in vivo*-Infektionsversuchen untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die Trcs keinen therapeutischen Effekt auf AFB-Infektionen haben, jedoch lässt sich eine Verlangsamung des Infektionsverlaufs erkennen. Ein ähnlicher verzögerter Infektionsverlauf konnte bereits bei der Anwendung des Bakteriophagen HB10c2 gezeigt werden (Beims *et al.*, 2015).

Der ausbleibende therapeutische Effekt kann auf verschiedene Ursachen zurückzuführen sein; beispielweise könnten die Peptide nach der Aufnahme durch die Larve degradiert werden. Zudem werden die Peptide erst an d<sub>4</sub> der Entwicklung zugefüttert, wohingegen die Infektion der Larven bereits an d<sub>1</sub> erfolgte, folglich konnten die Endosporen bereits in die Germination übergehen und sich vermehren. Im Rahmen dieser Vermehrung werden von *P. larvae* zahlreiche Toxine produziert und sezerniert (Genersch, 2010), die wiederum eine Schädigung der Larve mit sich bringen. Durch diese Vorschädigung könnte eine stärkere Sensitivität der Larven gegenüber den Trcs resultieren, wodurch der therapeutische Effekt ausbleibt. Weiterhin wurden die MHK lediglich für T<sub>E</sub> bestimmt, jedoch

nicht für  $T_{\text{Mix}}$ , sodass sich hier die Wirkungsspektren zwischen Mikrobiom, Pathogenen und Wirt nicht abbilden lassen. Um genauere Aufschlüsse über die Wirkung der Trcs im System der Biene zu erhalten müsste zunächst geklärt werden, ob die Trcs von den Larven oder gar dem Mikro- und Mycobiom abgebaut werden können beziehungsweise ob die Wirkstoffe bis in den Mitteldarm gelangen können. Würden die Trcs durch die peritrophische Matrix gelangen und in die Hämolymphe der Biene absorbiert werden, würden sich die Dosen der Wirkstoffe wiederum anders darstellen als ursprünglich angenommen. Bei der Annahme, dass das Volumen der Larve  $\sim 200 \mu\text{L}$  ausmacht und die Dosen der Applikation von  $T_E$   $9,15 \mu\text{g/mL}$  und für  $T_{\text{Mix}}$   $3,05 \mu\text{g/mL}$  betragen, müssten die Trcs im Larvenkörper stabil sein und sich gleichmäßig im gesamten Gewebe verteilen. Der Nachweis von *P. larvae* in 100% der verstorbenen Individuen im Rahmen dieser Versuche legt den Schluss nahe, dass die Trcs nach oraler Aufnahme nicht lokal auf den Mitteldarm von *A. mellifera* beschränkt sind oder gar von der Larve oder ihren Komensalen degradiert werden können. Bei der Betrachtung der toten Individuen fiel jedoch auf, dass diese zu einem Großteil das Larvenstadium selbst an  $d_{14}$  nicht verlassen hatten. Somit blieben das Aufrichten in der Zelle und die Defekation aus. Dieses Phänomen legt den Schluss nahe, dass eine Verbindung zwischen Mittel- und Enddarm nicht zu Stande gekommen ist. Aus den Ergebnissen von J. A. Vosloo geht hervor, dass Imagines von *A. mellifera* nach oraler Applikation hoher Konzentrationen von Trcs physiologische Anomalitäten durch Immobilisierung des Verdauungstraktes aufwiesen. Diese Beobachtung korreliert mit der Beobachtung, dass ein Großteil der Versuchstiere nicht in das Stadium der Vorpuppe übergegangen ist.

In Anbetracht der Ergebnisse liegt der Schluss nahe, die Vorschriften der OECD/OCD zur Bestimmung der Toxizität chemischer Substanzen gegenüber Bienenbrut über das Larvenstadium hinaus zu erweitern. Die Verbindung von Mittel- und Enddarm an  $d_7$  stellt einen wesentlichen Teil im Rahmen der Metamorphose dar, die für eine Vielzahl an Störungen anfällig zu sein scheint. Daher sollte neben dem Parameter der Mortalitätsbestimmung auch der Entwicklungsstatus der Brut als essentieller Bestandteil in die Auswertung der Ergebnisse einbezogen werden.

Die minimale Hemmkonzentration wurde gegenüber *P. larvae* bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte über die optische Dichte anhand von photometrischen Werten. Diese Methode detektiert folglich ab welcher Dosis keine Zunahme der optischen Dichte mehr erfolgte. Die entsprechende Messung ist also auf die Feststellung des Wachstums limitiert. Rückwirkend können also keine Aussagen dahingehend getroffen werden, ob die festgestellte  $MHK_{TE}$  von  $7,3 \mu\text{g/mL}$  gegenüber *P. larvae* bakteriostatisch oder bakteriolysisch wirkt. Um diese Unterscheidung treffen zu können müssten die entsprechenden Ansätze in Medium ohne  $T_E$  überführt und auf Wachstum überprüft werden. Würde ein bakterielles Wachstum festgestellt werden, könnte man die Wirkung des  $T_E$  als bakteriostatisch klassifizieren. Sofern ein Wachstum nicht festgestellt werden kann, handelt es sich um eine bakteriolysische Wirkung.

Die Ergebnisse der Versuche dieses Teilabschnittes lassen sich dahingehend deuten, dass die Trcs eine höhere biologische Aktivität gegenüber den Pathogenen aufweisen als gegenüber der Mikrobiota. Ferner liegt die Sensitivität von *A. mellifera* oberhalb dieser Dosen. Die verwendeten Dosen von näherungsweise  $3,05 \mu\text{g/mL}$  für  $T_{\text{Mix}}$  und  $9,15 \mu\text{g/mL}$  für  $T_E$  weisen in der Larve im Rahmen der Therapieversuche eine mäßige, bakteriostatische Wirkung auf, wodurch der Mortalitätsverlauf bei einer Infektion mit *P. larvae* und anschließender Applikation der Trcs verlangsamt wird. Alternativ besteht die Möglichkeit, dass die Dekapeptide durch die peritrophische Matrix und das Mitteldarmepithel ins Lumen und die Hämolymphe der Larve migrieren, sodass im Mitteldarm die  $MHK$  gegenüber *P. larvae* nicht erreicht wird. Somit vermehren sich die Bakterien langsamer als bei einer reinen Infektion mit *P. larvae*. Die Mortalität der Individuen resultiert aus dem typischen

Krankheitsverlauf einer AFB-Infektion, wenn der Tod nach dem Aufrichten der Larve zur Puppe stattfindet. Da jedoch auch in den Individuen, die das Larvalstadium selbst nach 14 d nicht verlassen hatten, *P. larvae* detektiert werden konnte, ist davon auszugehen, dass diese Laven eine Vorschädigung durch die Trcs durch das Erliegen der Peristaltik des Verdauungstraktes erhalten haben. Dadurch konnte sich das Pathogen wegen der ausbleibenden Defekalierung massiv im Mitteldarm vermehren und nach dem Tod der Larve das Gewebe zersetzen.

Zusammenfassend lässt sich das Resümee ziehen, dass die Trcs eine hohe biologische Aktivität gegenüber *P. larvae* in *in vitro*-Versuchen zeigen, diese Ergebnisse jedoch *in vivo* nicht bestätigt werden konnten. Folglich eignen sie sich nicht als neuartiges Therapeutikum im Kampf gegen die AFB.

Dennoch kann aus den Ergebnissen geschlussfolgert werden, dass die Anwendung der Trcs als Fungizid in der Landwirtschaft keine Gefahren für die Biene darstellt. Sowohl adulte als auch in der Entwicklung befindliche Bienen weisen eine verhältnismäßig hohe Toleranz gegenüber den Dekapeptiden auf, die wesentlich höher liegt als die Applikationsdosis im Bereich der Landwirtschaft (Vosloo *et al.*, 2017). Somit ist es als unwahrscheinlich anzusehen, dass ausgebrachte Trcs in einem bienenschädigenden Maße in das Volk eingetragen werden und es durch die Fütterung kontaminierten Materials zu Schädigungen der Brut kommt. Die Ergebnisse stellen eine maßgebliche Erweiterung zur Bestimmung der Bienenverträglichkeit von Pflanzenschutzmitteln dar. So wurde neben der Honigbiene selbst auch das bakterielle Mikrobiom betrachtet, das eine wichtige Rolle im Ökosystem Biene spielt. Hier ergaben die Versuche, dass die Sensitivität der Mikrobiota in etwa dem Bereich der Sensitivität der Honigbiene selbst liegt. Somit stellt die Auswahl an Vertretern des Mikrobioms der Honigbiene eine sinnvolle Erweiterung der Testkriterien zur Zulassung von Pflanzenschutzmitteln im Hinblick auf ihre Bienenverträglichkeit dar.

### 6.3 Phagentherapie im Kampf gegen die AFB

Im Rahmen dieser Arbeit konnte der *P. larvae*-spezifische Bakteriophage HB10c2 ausführlich charakterisiert werden. In ersten *in vivo*-Therapieversuchen konnte gezeigt werden, dass sich der Krankheitsverlauf der AFB nach einmaliger Applikation des Phagen zusammen mit den Sporen des AFB-Erregers, um etwa 24 h verlangsamt. Dennoch ließen sich bezogen auf die Gesamtmortalität der infizierten Individuen nach 14 d keine signifikanten Unterschiede feststellen.

#### 6.3.1 Singuläre Applikation des Bakteriophagen HB10c2

Anhand der lytischen Eigenschaften des isolierten Bakteriophagen HB10c2 aus AFB-Schleim und seiner lytischen Wirkung gegenüber allen weiteren getesteten Stämmen des Erregers wurde dieser Phage für initiale Therapieversuche *in vivo* verwendet. Die *in vitro* beobachtete starke biologische Aktivität gegenüber *P. larvae* konnte *in vivo* jedoch nicht bestätigt werden. Einen möglichen Grund hierfür stellt der Vermehrungszyklus der Bakteriophagen dar. Diese sind zur Replikation auf aktive Wirtszellen angewiesen und weisen außerhalb des Wirtes eine bedingte Stabilität gegenüber äußeren Einflüssen auf. In den initialen Versuchen wurden die Bakteriophagen zeitgleich mit dem infektiösen Agens, den Endosporen, des Entomopathogens *P. larvae* an die Larven von *A. mellifera* appliziert. Die Aufnahme beider Nahrungszusätze erfolgte oral. Somit stellen die primären Schritte der Verdauung innerhalb der Larve eine mögliche Quelle zur Degradation der Phagenpartikel dar. Ferner sind die ersten vegetativen Zellen des Wirtes (*P. larvae*) erst nach etwa 24 h in der infizierten Larve detektierbar (Yue *et al.*, 2008). Somit stellen die Zeitspanne von 24 h, der Weg von der oralen Aufnahme bis in den Mitteldarm, sowie die Verweilzeit im Mitteldarm bis zur Infektion der Wirtszelle durch den Bakteriophagen ein potentiell Intervall dar, in dem die Phagenpartikel enzymatisch oder mechanisch degradiert werden könnten. Vor diesem Hintergrund ist zu berücksichtigen, dass bereits während der Proliferation von *P. larvae* neben den vegetativen Zellen auch Sporen gebildet werden (Yue *et al.*, 2008). Diese können von den Bakteriophagen nicht infiziert werden und stellen somit einen natürlichen Schutzmechanismus des Wirtes dar. Dennoch scheinen die Bakteriophagen den Krankheitsverlauf bedingt verzögern zu können. Die finale Mortalität der infizierten Individuen unterschied sich nach 14 d nicht signifikant von der Kontrollinfektion. Somit konnte kein therapeutischer Effekt im Rahmen der zeitgleichen Applikation von Bakteriophagen und Pathogen nachgewiesen werden.

#### 6.3.2 Untersuchungen zur Virulenz von reisolieren *P. larvae*-Sporen aus zuvor therapierter Bienenbrut

Die *in vivo* Infektionsversuche mit *P. larvae*-Sporen, die zuvor aus therapierten aber dennoch abgetöteten Larven reisoliert wurden, zeigten eine signifikant niedrigere Mortalität der infizierten Individuen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dieses Phänomen könnte zum einen auf der Veränderung des Erbgutes des Erregers beruhen. Es ist bekannt, dass Bakterien im Rahmen der Kultivierung dazu neigen ihre Virulenz zu reduzieren, beziehungsweise sich im Rahmen der Kultivierung auf synthetisierten Nährmedien zu verändern. Zur Bestätigung dieser These stehen ergänzende Versuche zur Infektion von *A. mellifera*-Larven mit reisolierten Sporen aus den Infektionskontrollen jedoch noch aus. Andererseits könnte der vorhergehende Kontakt mit dem Bakteriophagen HB10c2 eine Erklärung liefern. Die Sequenzierung des Bakteriophagen erbrachte aufgrund der Ergebnisse zur Regulation der Transkription, sowie die Annotation einer Integrase Hinweise auf einen temperenten Phagen. Diese Art der Bakteriophagen kann in das Genom des Wirtes integrieren und Einfluss auf die Transkription des Wirtes nehmen. Folglich könnten im Rahmen der initialen Therapieversuche einige Bakteriophagen den lytischen Zyklus zur Lyse des Wirtes

eingeschlagen haben, andere jedoch in den lysogenen Zyklus übergegangen sein. Letztere würden somit in das Genom des Wirtes integrieren. Durch die Transkription phageneigener Gene zur Regulation der Wirtstranskription könnten somit zunächst entsprechende Phagengenome repliziert und in das Genom von *P. larvae* integriert werden. Der Eingriff des Phagen in die Transkription des Wirtes würde die Verzögerung in der Zunahme der Mortalität erklären. Hinzu kommt, dass durch die einmalige Integration des Bakteriophagen HB10c2 in das Wirtsgenom ein Prophage mit einer Genomgröße von 35,6 kbp zusätzlich im Genom vorliegt. Hierdurch würde sich die Zeit der Replikation entsprechend verändern. Die beiden Aspekte zur Beeinflussung der Transkription und die erhöhte Zeit für die Replikation der DNA würden eine erhöhte Generationszeit von *P. larvae* bewirken (Guttman *et al.* 2005). Hierdurch wäre die herabgesetzte Mortalität in der Infektion mit den reisolierten Sporen erklärt. Die Infektionsanfälligkeit der *A. mellifera*-Larven ist in den ersten 30 Lebensstunden am höchsten (Yue *et al.*, 2008). Innerhalb dieses kritischen Zeitfensters muss die Infektion mit etwa 10-15 Sporen erfolgen um eine letale Infektion herbeizuführen und die publizierten LT<sub>100</sub>-Werte zu erreichen. Durch die veränderte Generationszeit verschiebt sich der Vermehrungszyklus des Entomopathogens zu dessen Ungunsten, sodass weniger Larven erfolgreich infiziert werden können und die Mortalität sinkt. Dabei ist es durchaus denkbar, dass *P. larvae* durch den Prophagen bedingt im Falle einer nicht-letalen Infektion in die Sporulation übergeht und die Sporen mit dem Kot der Larve ausgeschieden werden und im Bienenvolk dann zu neuen Infektionen führen können. Evolutiv betrachtet wären hierdurch Vorteile für den integrierten Bakteriophagen und *P. larvae* geschaffen, da in keinem Falle der Wirt durch dessen Tod limitiert würde.

### 6.3.3 Genomsequenzierung des Bakteriophagen HB10c2

Die Genomanalyse des Bakteriophagen HB10c2 untermauert die zuvor aufgestellten Thesen zur Integration in das Wirtsgenom. Eines der fünf funktionellen Gencluster aus HB10c2 kodiert für eine hohe Anzahl regulatorisch wirkender Genprodukte. Im Zusammenhang mit den Genen zur Regulierung des lysogenen Zyklus sind die Voraussetzungen für die oben angeführte These *in silico* aufgezeigt. Ferner wurde der Bakteriophage HB10c2 durch die Sequenzierung und die vorhandenen Gene zum lysogenen Lebensstil als lysogener Phage identifiziert. Diese Ergebnisse decken sich mit den Literaturangaben zu den Bakteriophagen des B2-Morphotyps aus der Familie der *Siphoviridae*, die als temperente Bakteriophagen beschrieben sind (King *et al.*, 2012). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass identische Gene im Genom des Bakteriophagen phiIBB\_PI23 und *P. larvae* ERIC I (DSM 25719) mit HB10c2 vorliegen. Somit birgt diese Art der Bakteriophagen die Gefahr des horizontalen Gentransfers (Beims *et al.*, 2015; Merrill *et al.*, 2014; Oliveira *et al.*, 2013). Speziell im Bereich der Virulenzgene von *P. larvae* lassen sich Indizien auf phagenvermittelte Gentransfers vermuten. Die AB-Toxine Plx1 und Plx2 stellen einen essentiellen Virulenzfaktor des *P. larvae*-Genotypen ERIC I dar (Fünfhaus *et al.*, 2013). Die entsprechenden Gensequenzen lassen sich jedoch ebenso in drei verschiedenen *P. larvae*-spezifischen Bakteriophagen (Oliveira *et al.*, 2013; Tsourkas *et al.*, 2015) identifizieren (Phage Paisly KT361653.1; Phage Harrison KT361651.1; Phage phiIBB\_PI23 KF010834.1). Über die Genomannotation konnten kodierende Gene für lytische auf *P. larvae* wirkende Enzyme identifiziert werden. Diese bewirken im lytischen Zyklus des Bakteriophagen HB10c2 die Lyse der Wirtszelle. Die beiden Holine und die Amidase könnten den Ausgangspunkt für weitere Therapieansätze der AFB darstellen. Durch die Klonierung der entsprechenden Gene und die rekombinante Produktion wäre eine Applikation der lytisch wirkenden Enzyme an infizierte Larven denkbar. Bei dieser Art der Therapie kann, ähnlich der Phagentherapie, von einer sehr hohen Wirtsspezifität ausgegangen werden, sodass Nebenwirkungen bezogen auf andere (Mikro-) Organismen nicht zu erwarten wären. Im Gegensatz zur Phagentherapie im klassischen Sinne würde sich das therapeutische Agens bei dieser Form der Verabreichung jedoch nicht selbst dosieren, da eine Vermehrung innerhalb des Wirtes nicht möglich ist. Hinzu kämen entsprechende Zulassungsverfahren,

da es sich bei den rekombinant produzierten Enzymen nicht mehr um eine natürlich vorkommende biologische Ressource handelt. Ergänzend zu den bereits genannten Genen konnten weiterhin zwei Gene identifiziert werden, die gemäß der Annotation eine hohe Ähnlichkeit zu putativen  $\beta$ -Lactamasen aufweisen. In Verbindung mit den lysogenen Eigenschaften des Bakteriophagen ist eine Transduktion des Wirts mit der Folge einer Resistenz gegenüber  $\beta$ -Lactam-Antibiotika denkbar. Diese potentielle Gefahr stellt in Freilandversuchen ein nicht hinnehmbares Risiko für die Umwelt dar. Obgleich  $\beta$ -Lactame derzeit keine Anwendung gegen *P. larvae* finden und Antibiotika generell nur sehr bedingt gegen die AFB angewandt werden können. Durch horizontalen Gentransfer und die nahe phylogenetische Verwandtschaft von *P. larvae* zu anderen Firmicutes wäre das Risiko zur Verschleppung der entsprechenden Resistenzen in Betracht zu ziehen (Ash, C. *et al.*, 1991; Beims *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2013). Abschließend lässt sich feststellen, dass sowohl die *in silico*, *in vitro* und die *in vivo* Ergebnisse gezeigt haben, dass sich Bakteriophagen generell auch für die Lyse von *P. larvae* eignen, diese Eigenschaft aber nur bedingt zu therapeutischen Zwecken genutzt werden kann.

### 6.3.4 Isolation und Charakterisierung weiterer therapeutisch geeigneter Bakteriophagen

Parallel zur Isolation des Bakteriophagen HB10c2 erfolgten weitere Isolationen von Bakteriophagen aus ähnlichem Ausgangsmaterial (AFB-Schleim/-Schorf und Futterkranzproben). Die isolierten Bakteriophagen wurden zunächst nur morphologisch und anhand ihres Wirtsspektrums charakterisiert. Dabei wurden durchweg *Siphoviridae* mit nahezu identischen Eigenschaften zum Bakteriophagen HB10c2 gefunden. Analog zu den Literaturwerten musste zunächst davon ausgegangen werden, dass es sich bei diesen Bakteriophagen auf Grund der Morphologie und des Wirtsspektrums ebenfalls um temperente Bakteriophagen handelt (King *et al.*, 2012). Da es sich bei den Proben für die Bakteriophagenisolation durchweg um Material aus infizierten Bienenvölkern handelte, ist davon auszugehen, dass die temperenten Bakteriophagen aus der Familie der *Siphoviridae*, zugehörig zum B2-Morphotyp, die dominante Form der *P. larvae*-spezifischen Bakteriophagen in identifizierbaren AFB-Ausbrüchen ausmachen. Eine mögliche Begründung liegt in der temperenten Eigenschaft der Bakteriophagen. *P. larvae* ist in seiner ökologischen Nische auf die Vermehrung im Mitteldarm der Honigbiene *A. mellifera* angewiesen. Außerhalb dieser Nische liegen die Bakterien als Überdauerungsform in Form von Endosporen vor. Diese inaktive Form kann von den Bakteriophagen nicht für die Vermehrung genutzt werden. Ferner stellen das Hygieneverhalten der Honigbiene im Bienenstock, sowie andere äußere Einflüsse (z.B. Propolis, Temperatur) mögliche Umwelteinflüsse zur Degradierung des Phagenpartikels dar, sodass dieser ohne die aktive Form seines Wirtes nur eine sehr bedingte Stabilität aufweist. Durch den lysogenen Zyklus kann der Bakteriophage jedoch in das Genom seines Wirtes integrieren und als Prophage in der Spore die Zeit bis zu einer Neuinfektion überdauern. Schließlich kann nach der Germination der Spore der lytische Zyklus zur Vermehrung und Infektion weiterer Wirtszellen eingeschlagen werden. Bezogen auf die verheerenden Auswirkungen einer AFB-Infektion auf ein Bienenvolk (Tod des Volkes im Rahmen der fortschreitenden Infektion) stellt die Befähigung eines Bakteriophagen zur Lysogenie einen Vorteil in der reproduktiven Fitness verglichen mit rein-lytisch agierenden Bakteriophagen dar. Der Bakteriophage HB $\chi$  konnte als einziger der isolierten Bakteriophagen aus Ausgangsmaterial isoliert werden, in dem *P. larvae* nicht detektiert werden konnte.

Basierend auf den Ergebnissen der Sequenzierung des Bakteriophagen HB10c2 wurden die weiteren Bakteriophagenisolate mit Hilfe der PCR auf „kritische Gene“ hinsichtlich der Anwendung in der Phagentherapie überprüft. Hierzu zählten die beiden putativen  $\beta$ -Lactamasen und die Integrase aus HB10c2, zudem wurden die Isolate auf das Vorhandensein der N-acetylmuramoyl-L-alanin-Amidase



überprüft. Mit Ausnahme des Bakteriophagen HB $\chi$  konnten die betreffenden Markergene in allen Bakteriophagenisolaten nachgewiesen werden. Auf Grund der ähnlichen/identischen Isolationshabitate ist dieses Ergebnis plausibel und unterstützt zudem die zuvor aufgestellte These, dass der B2-Morphotyp lysogener Bakteriophagen den Großteil der *P. larvae*-spezifischen Bakteriophagen in AFB-af-fektierten Proben ausmacht. Aus dem Template des Bakteriophagen HB $\chi$  konnte lediglich ein PCR-Produkt für die N-acetylmuramoyl-L-alanin-Amidase amplifiziert werden. Folglich konnten die putativen  $\beta$ -Lactamasen und die Integrase nicht nachgewiesen werden. Diese Indizien lassen dieses Bakteriophagenisolat als geeignet für eine potentielle Phagentherapie erscheinen, da die Gefahr der Wirtstransduktion durch Integration in dessen Genom nicht gegeben zu sein scheint. Dabei ist jedoch zu beachten, dass die entsprechende PCR auf Basis der Sequenzdaten aus dem Bakteriophagen HB10c2 beruht. Da HB $\chi$  wie die anderen Bakteriophagen zum B2-Morphotyp der *Siphoviridae* zählt und diese als temperente Bakteriophagen beschrieben sind (King *et al.*, 2012), besteht ferner die Möglichkeit, dass HB $\chi$  über eine andere Integrase verfügt, deren Gensequenz nicht mit den Primern der Integrase aus HB10c2 (KP202972.1, HB\_00029) hybridisiert. Genauerem Aufschluss hierüber kann letztendlich nur die Sequenzierung des Gesamtgenoms liefern. Interessanterweise konnte *P. larvae* aus dem Probenmaterial, aus dem der Bakteriophage HB $\chi$  hervorgegangen ist, nicht isoliert werden. Eine potentielle Integrase, analog zur annotierten Integrase aus dem Genom des Bakteriophagen HB10c2, konnte durch Überprüfung mittels PCR im Genom des Phagen HB $\chi$  nicht nachgewiesen werden. Daraus kann die These formuliert werden, dass es sich bei HB $\chi$  um einen lytischen Bakteriophagen handelt, der seinen Wirt gänzlich eliminiert haben könnte. Eine weitere Möglichkeit stellt das Wirtsspektrum der untersuchten Bakteriophagen dar. Die Versuche haben gezeigt, dass alle Isolate neben *P. larvae* auch weitere Bacillales als potentielle Nebenwirte nutzen können. Da in der zugehörigen Probe des Bakteriophagen HB $\chi$  *P. larvae* nicht isoliert werden konnte, wäre es denkbar, dass HB $\chi$  auf einen anderen Vertreter der Bacillales spezialisiert ist und *P. larvae* als weiteren Wirt nutzen kann. Da hierdurch keine Abhängigkeit des Bakteriophagen von *P. larvae* gegeben ist, würde sich somit sein Auftreten ohne Vorhandensein des AFB-Erregers erklären. Zusammenfassend lässt sich aussagen, dass im Rahmen dieser Arbeit nur *Siphoviridae* des B2-Morphotyps mit lytischer Wirkung auf *P. larvae* aus dem verwendeten Material isoliert werden konnten. Um weitere Kandidaten für eine Phagentherapie zu isolieren und zu charakterisieren würde sich die Suche nach weiteren Bakteriophagen in anderem Ausgangsmaterial, wie beispielsweise nicht erkrankten oder asymptomatischen Völkern und Probenmaterial anbieten.

### 6.3.5 Phagentherapie durch tägliche Phagenapplikation während des Larvalstadiums

Die Ergebnisse der initialen Versuche zur Phagentherapie mit dem Bakteriophagen HB10c2 haben gezeigt, dass eine therapeutische Wirkung limitiert ist. Eine mögliche Erklärung dieser Limitierung könnte die Fähigkeit der Sporenbildung von *P. larvae* darstellen. Weiterhin könnte die Zeitspanne zwischen Aufnahme der Sporen und Bakteriophagen bis hin zur Infektion der vegetativen Zellen negative Einflüsse auf die Stabilität der Phagenpartikel zu haben. Hinzu kommen die potentiellen Einflüsse im Gewebe der *A. mellifera*-Larve auf die Phagenpartikel. Ferner besteht durch die Applikation temperenter Bakteriophagen die Gefahr der Transduktion des Wirtes. Entsprechende Überprüfungen des Bakteriophagen HB $\chi$  legen die Vermutung nahe, dass dieser weder über eine kritisch zu betrachtende Integrase, noch über die putativen  $\beta$ -Lactamasen verfügt. Diese Eigenschaften waren ausschlaggebend für die Versuche zur Phagentherapie mit dem Bakteriophagen HB $\chi$ . Um die bereits angeführten Probleme aus den initialen Therapieversuchen zu umgehen wurde der Phage kontinuierlich mit jeder Futtergabe an die Larven von *A. mellifera* appliziert. Diese Methode birgt den Vorteil, dass permanent intakte Bakteriophagen mit der Nahrung aufgenommen werden. Diese können ab d<sub>2</sub> im Mitteldarm direkt die vegetativen Zellen von *P. larvae* infizieren und auf diese Weise effektiver therapeutisch wirken. Durch die kontinuierliche Fütterung wird der artifizielle *in vivo*-

Versuch zudem an die natürlichen Strukturen im Bienenvolk adaptiert. Sofern Bakteriophagen im Rahmen einer AFB-Infektion in einem Bienenvolk vorhanden sind, werden sie auch kontinuierlich mit den Futtergaben an die Brut appliziert. Die Ergebnisse der kontinuierlichen Applikation von HB $\chi$  an infizierte Larven von *A. mellifera* wiesen am Ende der Versuche eine deutlich verringerte Gesamtmortalität der Individuen auf als die entsprechende Infektionskontrolle. Stattdessen konnten Vergleiche zwischen Therapiemortalität und Kontrollmortalität gezogen werden. Die deutlich verringerte Mortalität der Brut nach Therapie mit dem Bakteriophagen kann auf verschiedene Faktoren zurückgeführt werden. Zum einen wurde der Bakteriophage aus einer Probe isoliert, in der *P. larvae* nicht nachgewiesen werden konnte. Daher liegt die Schlussfolgerung nahe, dass in dem entsprechenden Volk eine potentielle AFB-Infektion durch die Bakteriophagen überwunden werden konnte, sodass der Erreger nicht mehr detektierbar ist. Diese lytische Wirkung des Bakteriophagen HB $\chi$  könnte im Rahmen der *in vivo*-Versuche ebenfalls zum Tragen gekommen sein, sodass die Mortalität der infizierten Tiere signifikant herabgesetzt wurde. Nichtsdestotrotz liegt die Mortalität der therapierten Tiere oberhalb der natürlichen Sterblichkeit. Ein Grund hierfür könnte die Infektionsdosis von 500 Sporen des Entomopathogens an die L1-Larven sein. Unter natürlichen Bedingungen reichen etwa 11 Sporen aus um eine Larve erfolgreich mit *P. larvae* zu infizieren (Yue *et al.*, 2008). Diese Dosis wurde in den durchgeführten Versuchen weit überschritten. Daraus könnte die erhöhte Mortalität der Therapiegruppe im Vergleich zur natürlichen Mortalität resultieren. Von daher scheint der Bakteriophage HB $\chi$  zunächst deutlich bessere therapeutische Erfolge zu liefern als der Bakteriophage HB10c2. Um einen abschließenden Vergleich zwischen diesen beiden Phagenisolaten ziehen zu können, müsste jedoch zunächst eine Sequenzierung des Genoms von HB $\chi$  erfolgen, um die verbesserte therapeutische Wirkung seinen potentiellen lytischen Eigenschaften zuzuschreiben. Hinzu kämen sicherheitsrelevante Aspekte, zu denen beispielweise Resistenzgene und weitere Integrasen und Virulenzfaktoren zählen, die durch Transduktion auf *P. larvae* oder andere Mikrobiota übertragen werden könnten. Auf Grund der Morphologie und der engen phylogenetischen Verwandtschaft zu den anderen Bakteriophagenisolaten würde das verwendete Isolat ebenfalls in die Gruppe der lysogenen Bakteriophagen fallen. Das Fehlen einer potentiellen Integrase wurde auf der Grundlage der Sequenz der einzigen Integrase aus dem Bakteriophagen HB10c2 geschlussfolgert. Folglich ist die vorläufige Eignung auf Grund einer fehlenden Integrase relativ zu betrachten. Ferner handelte es sich bei den beiden getesteten Therapieformen um eine singuläre Applikation zeitgleich mit der Sporenzugabe von *P. larvae* und im anderen Fall um eine kontinuierliche Applikation über die gesamte Larvalentwicklung hinweg. Von daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass der Bakteriophage HB10c2 bei kontinuierlicher Applikation eine ähnlich hohe therapeutische Wirkung erzielen könnte.

### 6.3.6 Phagentherapie als alternative Bekämpfungsmaßnahme gegen die AFB

Die beiden unterschiedlichen Verfahren zur Erprobung einer Phagentherapie im Kampf gegen die AFB mit unterschiedlichen Bakteriophagenisolaten haben gezeigt, dass sich therapeutische Effekte unter Laborbedingungen beobachten lassen. Die bisherigen Versuche basieren auf der klassischen Phagentherapie. Darüber hinaus ist auch die Applikation von rekombinant produzierten, lytisch wirkenden Enzymen aus den Bakteriophagen denkbar. Den limitierenden Faktor stellt jedoch die beschränkte Stabilität der Phagenpartikel gegenüber äußeren Einflüssen und vor allem ohne Wirt, sowie potentielle Risiken durch lysogen wirkende Bakteriophagen dar. Hierbei ist darauf zu achten, dass eine Transduktion der pathogenen Entomopathogene vermieden wird. In jedem Fall sind in weiteren Studien zur Eignung der Phagentherapie Optimierungen hinsichtlich der Applikation zu erproben und ökologische Wechselwirkungen zwischen therapeutischem Agens und ubiquitär vorkommender Mikrobiota auszuschließen. Gegenüber Antibiotika weisen Bakteriophagen den enormen Vorteil auf, dass von ihnen keine Resistenzbildung in anderer Mikrobiota induziert werden kann.

Durch die Charakterisierung der *P. larvae*-spezifischen Bakteriophagen konnte gezeigt werden, dass diese Phagen neben *P. larvae* auch weitere Wirte für ihre Vermehrung nutzen konnten. Weiterhin stellen Bakteriophagen die häufigste biologische Organisationsform auf der Erde dar (Weinbauer, 2004). Auf dem Gebiet der Analyse komplexer Lebensgemeinschaften ist das Phagobiom (Gesamtheit aller in einem System vorkommenden Bakteriophagen) ein essentieller Baustein. Dieser Baustein im Ökosystem Honigbiene könnte zum Verständnis der komplexen Wechselwirkungen zwischen Bienenvolk und Umwelt (z.B. Nahrungsangebot) und einzelnen Individuen (z.B. Imago und Brut) beitragen. Vor dem Hintergrund der AFB könnte das Phagobiom, ähnlich dem Mikrobiom, einen wichtigen Aspekt des Immunsystems der Honigbiene darstellen. So könnte über die unterschiedliche Struktur des Phagobioms das Mikrobiom im Mitteldarm nachhaltig beeinflusst werden, woraus sich wiederum eine adaptierte Symbiose zwischen Biene, Mikrobiom, Mycobiom und Phagobiom ableiten ließe. Hieraus könnten beispielweise Phänomene wie die unterschiedliche Toleranz verschiedener Bienenvölker gegenüber Infektionskrankheiten erklärt werden.

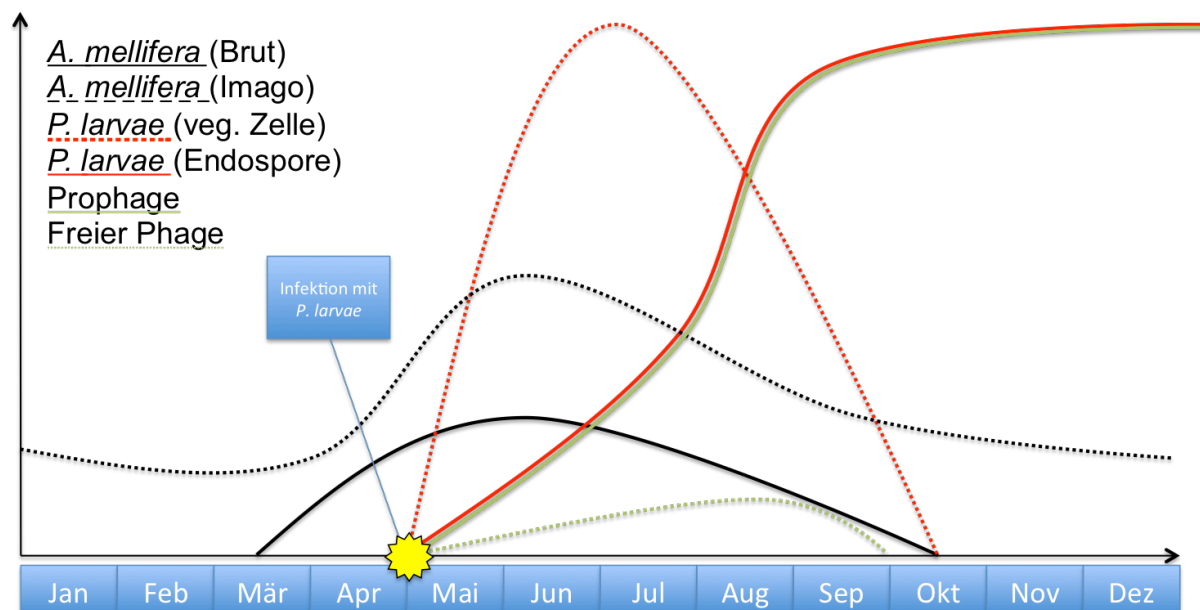
Zusammenfassend konnten die grundsätzliche Möglichkeit für den Einsatz von *P. larvae*-spezifischen Bakteriophagen für den Einsatz im Kampf gegen die AFB aufgezeigt werden. Zudem wurde ein Spektrum an Sicherheitsmaßnahmen zur Vermeidung negativer ökologischer Wechselwirkungen beschrieben. Neben der klassischen Phagentherapie stellen der Einsatz von Applikationen mehrerer Bakteriophagen oder rekombinant produzierte lytisch wirkende Enzyme aus dem Genom der Bakteriophagen eine weitere Option für die Bekämpfung der AFB dar.

### **6.3.7 Coevolution zwischen Biene, AFB-Erreger und Bakteriophage**

Die Analyse verschiedene Bakteriophagenisolate hat zuvor gezeigt, dass nahezu alle isolierten *P. larvae*-spezifischen Bakteriophagen über eine Integrase verfügen, die es ihnen ermöglicht in das Genom ihres Wirtes zu integrieren. Ebenso weisen die gefundenen Morphotypen auf lysogene Bakteriophagen hin (King *et al.*, 2012).

Diese Eigenschaft deutet darauf hin, dass sowohl die Bakteriophagen als auch ihr Wirt *P. larvae* sich im Laufe der Evolution an den Lebenszyklus des Bienenvolkes angepasst haben. Das Bienenvolk überwintert als gesamte Einheit und einer brutlosen Wintertraube in seiner Behausung auf den Waben und ernährt sich dabei von den eingelagerten Futtermitteln aus den Waben. Dabei ist es für die Biene essentiell mit den vorhandenen Reserven und der Bienenmasse nachhaltig zu wirtschaften um das Frühjahr lebensfähig zu erreichen. Die Winterbienen werden in den späten Monaten eines Jahres geschont, sodass sie den Winter „unverbraucht“ erreichen und in der Wintertraube überleben können. Die Temperatur im Bienenvolk sinkt dabei von 35 °C auf etwa 10 °C ab (Kettner *et al.*, 1988). Die Brutaktivität wird im Herbst eingestellt. Dadurch werden die Eiweiß- und Kohlenhydratvorräte (Pollen, bzw. Bienenbrot und Futter) geschont. Nach der Winterruhe beginnt die Königin im Frühjahr mit dem Anlegen eines Brutnestes und das Bienenvolk geht in die aktive Phase des Bienenjahres über. *P. larvae* ist als Entomopathogen an den Lebenszyklus der Biene angepasst, sodass lediglich *A. mellifera* als Wirt genutzt werden kann (Genersch, 2010). Im Bienenvolk liegt *P. larvae* über das gesamte Jahr als Endospore vor, die in dieser Form über Jahrzehnte hinweg infektiös und keimungsfähig bleiben kann (Kettner *et al.*, 1988), wohingegen die vegetative Form lediglich in der Brutphase des Bienenvolkes vorkommt. Als Endospore kann der AFB-Erreger außerhalb der Brut überdauern und die brutfreie Winterphase im Bienenvolk überstehen, sodass im Frühjahr bei der Inkorporation von *P. larvae*-Sporen neue Infektionen in der Brut entstehen. Bakteriophagen sind ebenfalls hochgradig wirtsspezifisch. Das heißt im Falle von *P. larvae*-spezifischen Bakteriophagen, dass diese evolutiv auch an den Lebenszyklus der Honigbiene angepasst sein müssen, speziell für die Überdauerung der Brutfreien Zeit. Der Aufbau von Bakteriophagen setzt sich in den meisten Fällen aus einer Proteinhülle (Capsid) und der darin enthaltenen Erbinformation (DNA oder RNA) zusammen.

Durch diese simple biologische Organisation sind Viren generell anfällig gegenüber äußeren Einflüssen (Trockenheit, Temperatur, mechanische Reize u.v.m.). Entsprechend lässt sich vermuten, dass die Bakteriophagen nur sehr bedingt in der Lage sind die brutfreie Zeit im Bienenvolk ohne die nutzbare vegetative Form ihres Wirtes zu überstehen. Hinzu kommt, dass beim Wiedereinsetzen des Brutgeschäftes zunächst junge Bienenlarven mit dem AFB-Erreger infiziert werden müssten und diese infizierten Larven dann zusätzlich mit den separat überwinterten Bakteriophagen infiziert werden müssten, damit der Bakteriophage weiterhin im Bienenvolk präsent ist. Aus evolutiver Betrachtungsweise ermöglicht die Integrase dem Bakteriophagen in das Genom seines Wirtes zu integrieren. Dieser überwintert im Bienenvolk als Endospore, die wiederum den Bakteriophagen als Prophagen im Genom tragen könnte. Somit wäre für den Bakteriophagen eine erfolgreiche Überwinterung in seinem Wirt sichergestellt, sodass parallel mit dessen Vermehrung nach der Winterpause eine Vermehrung des Bakteriophagen einhergehen könnte (**Abbildung 23**). Entsprechend dieser Hypothese wäre die Anzahl der freien Bakteriophagen in einem Bienenvolk relativ gering, da diese nur parallel mit den vegetativen Zellen innerhalb einer infizierten Larve vorkommen würden. Die infizierten Larven werden hingegen in den meisten Fällen nicht von den Ammen erkannt. Erst zum Ende der Brutperiode ließe sich auf Grund des günstigen Verhältnisses zwischen Ammenbienen und Brutzellen vermuten lassen, dass erkrankte Larven erkannt und die betroffenen Zellen ausgeräumt werden. Vor dem Hintergrund, dass sich Bienenvölker vornehmlich im Herbst durch Räuberei mit *P. larvae* infizieren, könnte der Bakteriophage als freier Phage in dieser Zeit in andere Bienenvölker gelangen und sich dort als Prophage in einem anderen, dort bereits etablierten Wirtsstamm, manifestieren. Somit könnte der Bakteriophagen von einem Wirt auf den anderen überspringen.



**Abbildung 23: Populationsmodell des relativen Vorkommens von *A. mellifera*, *P. larvae* und *P. larvae*-spezifischem Bakteriophage.** Die Grafik stellt verschiedene Formen der drei betrachteten Organismen im Jahreszeitlichen Verlauf dar.

Im Zusammenhang mit der Virulenz von reisolierten *P. larvae*-Sporen aus zuvor therapierter Bienenbrut kann eine weitere Hypothese zum evolutiv entstandenen Zusammenspiel zwischen Honigbiene, AFB-Erreger und Bakteriophage aufgestellt werden. Bei Infektionen mit *P. larvae* führen diese mittelfristig zum Niedergang des Bienenvolkes (Kettner *et al.*, 1988). Der Wirt würde somit getötet werden und der Erreger überdauert als Endosporen im Wabenwerk und den Futterreserven. Der AFB-Erreger konnte möglicherweise zuvor durch Räuberei in ein anderes Bienenvolk gelangen und sein Überleben sichern. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass reisiolierte Sporen von

*P. larvae* aus Therapieversuchen mit dem Bakteriophagen HB10c2 eine reduzierte Virulenz aufwiesen. Sofern diese reduzierte Virulenz sich auf den integrierten Prophagen zurückführen ließe, könnte dieser Effekt damit begründet werden, dass der Bakteriophage auf diese Weise seinen Lebensraum (*P. larvae*) dadurch sichert und erhält, dass er dessen Lebensraum (das Bienenvolk) länger am Leben erhält.

Diese Punkte zeigen abschließend deutlich, dass die *P. larvae* hochgradig an die jahreszeitliche Entwicklung von Bienenvölkern angepasst ist. Die Brut der Biene fungiert als Wirt des AFB-Erregers, wohingegen die Imagines als Vektor fungieren. Die Spore des Entomopathogens stellt hierbei das infektiöse, überdauerungsfähige Agens dar, das über die Imagines verbreitet und von den Larven aufgenommen werden kann. Die vegetative Form von *P. larvae* lässt sich nur in der Bienenbrut finden. Die Brutfreie Zeit überdauert der AFB-Erreger als Endospore im Bienenvolk. Bakteriophagen sind für ihren Vermehrungszyklus auf das Vorkommen vegetativer Wirtszellen angewiesen. Die brutfreie Zeit des Bienenvolkes, in der auch keine vegetativen Formen des AFB-Erregers vorhanden sind, überdauern die lysogenen *P. larvae*-spezifischen Bakteriophagen als Prophage im Genom ihres Wirtes. Diese These wird zudem durch die Ergebnisse der Genomsequenzierung der *P. larvae*-Genotypen ERIC I-V gestützt, die jeweils Sequenzen enthalten, die auf Prophagen hindeuten.

## 7 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnten Ergebnisse zu der Verbreitung der Genotypen von *P. larvae* generiert werden, zudem wurde der neue Genotyp ERIC V isoliert und charakterisiert. Der Vergleich der fünf Genotypen zeigte, dass sich die Genotypen in ihrer Virulenz auf Volks- und Individuenebene unterscheiden. Die fünf ERICs können anhand ihrer LT<sub>100</sub> auf Individuenebene in schnelle, moderate und langsame Killertypen eingeteilt werden. Durch die Ergebnisse der *de novo* Sequenzierung konnten verschiedene potentielle Virulenzfaktoren identifiziert werden, die spezifisch für den moderaten Killertyp (ERIC II) und die schnellen Killertypen (ERIC III-V) sind. In weiterführenden Arbeiten sollten diese Gene in den entsprechenden Genotypen hinsichtlich ihrer Funktion charakterisiert werden. Darüber hinaus könnte überprüft werden, ob durch die Inaktivierung dieser spezifischen Gene eine Änderung in der LT<sub>100</sub> erreicht wird.

Bei der Behandlung von Honigbienen mit Tyrothricin konnten zunächst keine negativen Effekte auf die adulten Tiere beobachtet werden. Auf der anderen Seite konnte gezeigt werden, dass Tyrothricin eine potente Aktivität gegenüber verschiedenen Bienenpathogenen besitzt. In anschließenden Therapieversuchen wurde jedoch festgestellt, dass die Bienenbrut nach Applikation von Tyrothricin nicht mehr in der Lage ist sich zu verpuppen. Durch weiterführende Experimente könnten der Wirkmechanismus von Tyrothricin und die hervorgerufenen physiologische Schädigungen während der Metamorphose der Bienenlarven untersucht werden.

Die Ergebnisse für die Phagentherapie im Kampf gegen die AFB müssen differenziert betrachtet werden. Zum einen konnte ein Konzept für eine sichere Phagentherapie der AFB erarbeitet werden. Zum anderen wurde jedoch auch deutlich, dass die lysogenen Eigenschaften der Bakteriophagen und die Abundanz von *P. larvae* als Endospore im Bienenvolk die Einsatzmöglichkeiten der Phagentherapie einschränken. Eine Weiterentwicklung der Phagentherapie könnte der Einsatz von rekombinant produzierten lytischen Enzymen (Lysinen) sein, die für Prophylaxe- oder Therapie-Zwecke getestet werden könnten.

Durch die genomischen Analysen der *P. larvae* Genotypen ERIC I-V, sowie durch die Sequenzierung des Genoms des Bakteriophagen HB10c2 und weiterer publizierter Phagengenome liegen nun große Datenmengen vor. Bereits bei der Betrachtung einzelner Gene in *P. larvae* fiel auf, dass diese von mobilen genetischen Elementen wie Transposons, Transposasen und Prophagengenomen flankiert werden. Vor diesem Hintergrund bieten sich weiterführende Arbeiten zum Spektrum der vorkommenden *P. larvae*-spezifischen Bakteriophagen an. Desweiteren können diese Daten genutzt werden, um Gene mit hoher Homologie zu Phagen-Genen im Genom von *P. larvae* zu identifizieren und die Bakteriophagen-getriebene-Evolution von *P. larvae* zu analysieren.

## 8 Verzeichnisse

### 8.1 Literaturverzeichnis

- Ash, C., Farrow, J.A.E., Wellbanks, S., Collins, M.D., 1991. Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small subunit ribosomal RNA sequences. *Lett. Appl. Microbiol.* 13, 202–206.
- Ash, C., Priest, F.G., Collins, M.D., 1993. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. *Antonie Van Leeuwenhoek* 64, 253–260.
- Bailey, L., 1957. The isolation and cultural characteristics of *Streptococcus pluton* and further observations on *Bacterium eurydice*. *J. Gen. Microbiol.* 17, 39–48. <https://doi.org/10.1099/00221287-17-1-39>.
- Bailey, L., Ball, B.V., 1991. *Honey Bee Pathology*. Academic Press. London.
- Bailey, L., Gibbs, A.J., 1962. Cultural characters of *Streptococcus pluton* and its differentiation from associated enterococci. *J. Gen. Microbiol.* 28, 385–391. <https://doi.org/10.1099/00221287-28-3-385>.
- Beims, H., 2013. Charakterisierung des *P. larvae*-spezifischen Bakteriophagen 10c2 und seine Anwendung in der Phagentherapie. Technische Universität Braunschweig.
- Beims, H., 2012a. Molekularbiologische Nachweismethoden der Bienenpathogene *Melissococcus plutonius* und *Paenibacillus larvae* (B. Sc.-Arbeit). Technische Universität Braunschweig, Braunschweig.
- Beims, H., 2012b. Isolierung *Paenibacillus larvae*-spezifischer Bakteriophagen aus Futterkranzproben und Faulbrutschleim (Protokoll Modul IB 26, WS 2012/13). Technische Universität Braunschweig.
- Beims, H., Wittmann, J., Bunk, B., Spröer, C., Rohde, C., Günther, G., Rohde, M., von der Ohe, W., Steinert, M., 2015. *Paenibacillus larvae*-Directed Bacteriophage HB10c2 and Its Application in American Foulbrood-Affected Honey Bee Larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 5411–5419. <https://doi.org/10.1128/AEM.00804-15>.
- Bienenseuchen-Verordnung in der Fassung der Bekanntmachung vom 3. November 2004 (BGBl. I S. 2738), die zuletzt durch Artikel 7 der Verordnung vom 17. April (BGBl. I S. 388) geändert worden ist), 2014.
- Cai, J., Collins, M.D., 1994. Evidence for a close phylogenetic relationship between *Melissococcus pluton*, the causative agent of European foulbrood disease, and the genus *Enterococcus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44, 365–367. <https://doi.org/10.1099/00207713-44-2-365>.
- Casteels, P., Ampe, C., Jacobs, F., Vaeck, M., Tempst, P., 1989. Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. *EMBO J.* 8, 2387–2391.
- Cremer, S., Armitage, S.A.O., Schmid-Hempel, P., 2007. Social immunity. *Curr. Biol.* CB 17, R693–702. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.06.008>.
- De Guzman, Z.M., Cervancia, C.R., Dimasuay, K.G.B., Tolentino, M.M., Abrera, G.B., Cobar, M.L.C., Fajardo, A.C., Sabino, N.G., Manila-Fajardo, A.C., Feliciano, C.P., 2011. Radiation inactivation of *Paenibacillus larvae* and sterilization of American Foul Brood (AFB) infected hives using Co-60 gamma rays. *Appl. Radiat. Isot. Data Instrum. Methods Use Agric. Ind. Med.* 69, 1374–1379. <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2011.05.032>.
- Djukic, M., Brzuszkiewicz, E., Fünfhaus, A., Voss, J., Gollnow, K., Poppinga, L., Liesegang, H., Garcia-Gonzalez, E., Genersch, E., Daniel, R., 2014a. How to kill the honey bee larva: genomic potential and virulence mechanisms of *Paenibacillus larvae*. *PloS One* 9, e90914. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090914>.
- Ebeling, J., Knispel, H., Hertlein, G., Fünfhaus, A., Genersch, E., 2016. Biology of *Paenibacillus larvae*, a deadly pathogen of honey bee larvae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 7387–7395. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7716-0>.
- Forsgren, E., 2010. European foulbrood in honey bees. *J. Invertebr. Pathol.* 103 Suppl 1, S5–9. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.016>.

- Forsgren, E., Olofsson, T.C., Vázquez, A., Fries, I., 2010. Novel lactic acid bacteria inhibiting *Paenibacillus larvae* in honey bee larvae. *Apidologie* 41, 99–108. <https://doi.org/10.1051/apido/2009065>.
- Fünfhaus, A., Poppinga, L., Genersch, E., 2013. Identification and characterization of two novel toxins expressed by the lethal honey bee pathogen *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood. *Environ. Microbiol.* 15, 2951–2965. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12229>.
- Garcia-Gonzalez, E., Genersch, E., 2013. Honey bee larval peritrophic matrix degradation during infection with *Paenibacillus larvae*, the aetiological agent of American foulbrood of honey bees, is a key step in pathogenesis. *Environ. Microbiol.* 15, 2894–2901. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12167>.
- Garcia-Gonzalez, E., Müller, S., Ensle, P., Süssmuth, R.D., Genersch, E., 2014a. Elucidation of sevadicin, a novel non-ribosomal peptide secondary metabolite produced by the honey bee pathogenic bacterium *Paenibacillus larvae*. *Environ. Microbiol.* 16, 1297–1309. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12417>.
- Garcia-Gonzalez, E., Poppinga, L., Fünfhaus, A., Hertlein, G., Hedtke, K., Jakubowska, A., Genersch, E., 2014b. *Paenibacillus larvae* chitin-degrading protein PICBP49 is a key virulence factor in American Foulbrood of honey bees. *PLoS Pathog.* 10, e1004284. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004284>.
- Genersch, E., 2010. American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. *J. Invertebr. Pathol.* 103 Suppl 1, S10-19. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.015>.
- Genersch, E., 2008. Europäische Faulbrut und Amerikanische Faulbrut, ein kurzer Überblick.
- Genersch, E., Ashiralieva, A., Fries, I., 2005. Strain- and genotype-specific differences in virulence of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, a bacterial pathogen causing American foulbrood disease in honeybees. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 7551–7555. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.7551-7555.2005>.
- Genersch, E., Forsgren, E., Pentikäinen, J., Ashiralieva, A., Rauch, S., Kilwinski, J., Fries, I., 2006. Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvificiens* and *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 501–511. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63928-0>.
- Goblirsch, M.J., Spivak, M.S., Kurti, T.J., 2013. A cell line resource derived from honey bee (*Apis mellifera*) embryonic tissues. *PloS One* 8, e69831. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069831>.
- Govan, V.A., Allsopp, M.H., Davison, S., 1999. A PCR detection method for rapid identification of *Paenibacillus larvae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2243–2245.
- Govan, V.A., Brözel, V., Allsopp, M.H., Davison, S., 1998. A PCR detection method for rapid identification of *Melissococcus pluton* in honeybee larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1983–1985.
- Guttman, B., Raya R., Kutter E., 2005. Basic phage biology. *Bacteriophages: Biology and Applications* (Kutter, E., Sulakvelidze, A., ed.). CRD Press, FL, 29-66.
- H Kettner, Borchard, H., Euthin, P., Gerlt-Seifert, L., Göhler, W., Kettner, B., Kunzemann, G., Meyerhoff, G., Pritsch, G., 1988. Grundwissen für Imker, 3rd ed, Lehrbuch für die Facharbeiterausbildung. VEB Deutscher Landwirtschaftsverlag Berlin.
- Han, S.-H., Lee, D.-B., Lee, D.-W., Kim, E.-H., Yoon, B.-S., 2008. Ultra-rapid real-time PCR for the detection of *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American Foulbrood (AFB). *J. Invertebr. Pathol.* 99, 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.04.010>
- Hardt, M., 2016. Sanieren oder keulen? *Dtsch. Bienenjournal* 24(3), 18–21.
- Hernández-Martínez, P., Naseri, B., Navarro-Cerrillo, G., Escrache, B., Ferré, J., Herrero, S., 2010. Increase in midgut microbiota load induces an apparent immune priming and increases tolerance to *Bacillus thuringiensis*. *Environ. Microbiol.* 12, 2730–2737. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02241.x>.
- Herrmann, M., Trenzcek, T., Fahrenhorst, H., Engels, W., 2005. Characters that differ between diploid and haploid honey bee (*Apis mellifera*) drones. *Genet. Mol. Res.* 4, 624–641.
- Hertlein, G., Müller, S., Garcia-Gonzalez, E., Poppinga, L., Süssmuth, R.D., Genersch, E., 2014. Production of the catechol type siderophore bacillibactin by the honey bee pathogen *Paenibacillus larvae*. *PloS One* 9, e108272. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108272>.



- Hertlein, G., Seiffert, M., Gensel, S., Garcia-Gonzalez, E., Ebeling, J., Skobalj, R., Kuthning, A., Süssmuth, R.D., Genersch, E., 2016. Biological Role of Paenilarvins, Iturin-Like Lipopeptide Secondary Metabolites Produced by the Honey Bee Pathogen *Paenibacillus larvae*. PLOS ONE 11, e0164656. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164656>.
- Heyndrickx, M., Vandemeulebroecke, K., Hoste, B., Janssen, P., Kersters, K., De Vos, P., Logan, N.A., Ali, N., Berkeley, R.C., 1996. Reclassification of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *pulvifaciens* (Nakamura 1984) Ash *et al.* 1994, a later subjective synonym of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *larvae* (White 1906) Ash *et al.* 1994, as a subspecies of *P. larvae*, with emended descriptions of *P. larvae* as *P. larvae* subsp. *larvae* and *P. larvae* subsp. *pulvifaciens*. Int. J. Syst. Bacteriol. 46, 270–279. <https://doi.org/10.1099/00207713-46-1-270>.
- Human, H., Brodschneider, R., Dietemann, V., Dively, G., Ellis, J.D., Forsgren, E., Fries, I., Hatjina, F., Hu, F.-L., Jaffé, R., Jensen, A.B., Köhler, A., Magyar, J.P., Özkýrým, A., Pirk, C.W.W., Rose, R., Strauss, U., Tanner, G., Tarpy, D.R., Steen, J.J.M. van der, Vaudo, A., Vejsnæs, F., Wilde, J., Williams, G.R., Zheng, H.-Q., 2013. Miscellaneous standard methods for *Apis mellifera* research. J. Apic. Res. 52, 1–53. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.10>.
- Katznelson, H., 1950. *Bacillus pulvifaciens* (n. Sp.), an organism associated with powdery scale of honeybee larvae. J. Bacteriol. 59, 153–155.
- Kettner, H., Borchardt, H., Euthin, P., Gerlt-Seifert, L., Göhler, W., Kettner, B., Kunzemann, G., Meyerhoff, G., Pritsch, G., 1988. Grundwissen für Imker, 3rd ed. VEB Deutscher Landwirtschaftsverlag, Berlin.
- King, A.M., Lefkowitz, E., Adams, M.J., Carstens, E.B., 2012. Virus Taxonomy. Elsevier, Oxford, UK.
- Kries, H., 2016. Biosynthetic engineering of nonribosomal peptide synthetases. J. Pept. Sci. Off. Publ. Eur. Pept. Soc. 22, 564–570. <https://doi.org/10.1002/psc.2907>.
- LAVES IB Celle, n.d. Nachweis von *Paenibacillus larvae* in Futterkranz- und Honigproben.
- Leussa, A.N.-N., Rautenbach, M., 2014. Detailed SAR and PCA of the tyrocidines and analogues towards leucocin A-sensitive and leucocin A-resistant *Listeria monocytogenes*. Chem. Biol. Drug Des. 84, 543–557. <https://doi.org/10.1111/cbdd.12344>.
- Lüken, D.J., Janke, M., Lienau, F.-W., Ohe, W. von der, Forster, R., 2012. Weiterentwicklung einer Methode zur Bienenbruthaltung unter Laborbedingungen. J. Für Verbraucherschutz Leb. 7, 141–145. <https://doi.org/10.1007/s00003-012-0759-y>.
- Marinelli, L.J., Piuri, M., Swigonová, Z., Balachandran, A., Oldfield, L.M., van Kessel, J.C., Hatfull, G.F., 2008. BRED: a simple and powerful tool for constructing mutant and recombinant bacteriophage genomes. PloS One 3, e3957. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003957>.
- Merrill, B.D., Grose, J.H., Breakwell, D.P., Burnett, S.H., 2014. Characterization of *Paenibacillus larvae* bacteriophages and their genomic relationships to firmicute bacteriophages. BMC Genomics 15, 745. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-745>.
- Mohr, K.I., Tebbe, C.C., 2007. Field study results on the probability and risk of a horizontal gene transfer from transgenic herbicide-resistant oilseed rape pollen to gut bacteria of bees. Appl. Microbiol. Biotechnol. 75, 573–582. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-0846-7>.
- Mohr, K.I., Tebbe, C.C., 2006. Diversity and phylotype consistency of bacteria in the guts of three bee species (Apoidea) at an oilseed rape field. Environ. Microbiol. 8, 258–272. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00893.x>.
- Morrissey, B.J., Helgason, T., Poppinga, L., Fünfhaus, A., Genersch, E., Budge, G.E., 2015. Biogeography of *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood, using a new multilocus sequence typing scheme. Environ. Microbiol. 17, 1414–1424. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12625>.
- Müller, S., Garcia-Gonzalez, E., Genersch, E., Süssmuth, R.D., 2015. Involvement of secondary metabolites in the pathogenesis of the American foulbrood of honey bees caused by *Paenibacillus larvae*. Nat. Prod. Rep. 32, 765–778. <https://doi.org/10.1039/C4NP00158C>.
- Müller, S., Garcia-Gonzalez, E., Mainz, A., Hertlein, G., Heid, N.C., Mösker, E., van den Elst, H., Overkleeft, H.S., Genersch, E., Süssmuth, R.D., 2014. Paenilamicin: structure and biosynthesis of a hybrid nonribosomal peptide/polyketide antibiotic from the bee pathogen *Paenibacillus larvae*. Angew. Chem. Int. Ed Engl. 53, 10821–10825. <https://doi.org/10.1002/anie.201404572>.

- Munderloh, U.G., Kurtti, T.J., 1989. Formulation of medium for tick cell culture. *Exp. Appl. Acarol.* 7, 219–229.
- Murray, K.D., Aronstein, K.A., 2008. Transformation of the Gram-positive honey bee pathogen, *Paenibacillus larvae*, by electroporation. *J. Microbiol. Methods* 75, 325–328. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.07.007>.
- OECD/OCDE TG 237, 2012. Honey bee (*Apis mellifera*) larval toxicity test, single exposure.
- Oliveira, A., Melo, L.D.R., Kropinski, A.M., Azeredo, J., 2013. Complete Genome Sequence of the Broad-Host-Range *Paenibacillus larvae* Phage phiIBB\_P123. *Genome Announc.* 1. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00438-13>.
- Pohl, F., 2005. Bienenkrankheiten. Kosmos.
- Poppinga, L., Janesch, B., Fünfhaus, A., Sekot, G., Garcia-Gonzalez, E., Hertlein, G., Hedtke, K., Schäffer, C., Genersch, E., 2012. Identification and functional analysis of the S-layer protein SplA of *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American Foulbrood of honey bees. *PLoS Pathog.* 8, e1002716. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002716>.
- Riessberger-Gallé, U., Hernández-López, J., Rechberger, G., Crailsheim, K., Schuehly, W., 2016. Lysophosphatidylcholine acts in the constitutive immune defence against American foulbrood in adult honeybees. *Sci. Rep.* 6, 30699. <https://doi.org/10.1038/srep30699>.
- Salmela, H., Amdam, G.V., Freitak, D., 2015. Transfer of Immunity from Mother to Offspring is Mediated via Egg-Yolk Protein Vitellogenin. *PLoS Pathog.* 11, e1005015. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005015>.
- Sokół, R., 1999. [Immune polypeptides activity in bee hemolymph]. *Wiad. Parazytol.* 45, 411–416.
- Sood, S., Steinmetz, H., Beims, H., Mohr, K.I., Stadler, M., Djukic, M., von der Ohe, W., Steinert, M., Daniel, R., Müller, R., 2014. Paenilarvins: Iturin family lipopeptides from the honey bee pathogen *Paenibacillus larvae*. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* 15, 1947–1955. <https://doi.org/10.1002/cbic.201402139>.
- Spathelf, B.M., Rautenbach, M., 2009. Anti-listerial activity and structure-activity relationships of the six major tyrocidines, cyclic decapeptides from *Bacillus aneurinolyticus*. *Bioorg. Med. Chem.* 17, 5541–5548. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.06.029>.
- Stahly, D.P., Alippi, A.M., Bakhiet, N., Campana, C.F., Novak, C.C., Cox, R., 1999. PPL1c, a Virulent Mutant Bacteriophage Useful for Identification of *Paenibacillus larvae* subspecies *larvae*. *J. Invertebr. Pathol.* 74, 295–296. <https://doi.org/10.1006/jipa.1999.4893>.
- Stammen, S., Müller, B.K., Korneli, C., Biedendieck, R., Gamer, M., Franco-Lara, E., Jahn, D., 2010. High-yield intra- and extracellular protein production using *Bacillus megaterium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 4037–4046. <https://doi.org/10.1128/AEM.00431-10>.
- Stow, A., Briscoe, D., Gillings, M., Holley, M., Smith, S., Leys, R., Silberbauer, T., Turnbull, C., Beattie, A., 2007. Antimicrobial defences increase with sociality in bees. *Biol. Lett.* 3, 422–424. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2007.0178>.
- Takamatsu, D., Sato, M., Yoshiyama, M., 2016. Infection of *Melissococcus plutonius* clonal complex 12 strain in European honeybee larvae is essentially confined to the digestive tract. *J. Vet. Med. Sci. Jpn. Soc. Vet. Sci.* 78, 29–34. <https://doi.org/10.1292/jvms.15-0405>.
- Tian, B., Fadhil, N.H., Powell, J.E., Kwong, W.K., Moran, N.A., 2012. Long-term exposure to antibiotics has caused accumulation of resistance determinants in the gut microbiota of honeybees. *mBio* 3. <https://doi.org/10.1128/mBio.00377-12>.
- Troskie, A.M., de Beer, A., Vosloo, J.A., Jacobs, K., Rautenbach, M., 2014a. Inhibition of agronomically relevant fungal phytopathogens by tyrocidines, cyclic antimicrobial peptides isolated from *Bacillus aneurinolyticus*. *Microbiol. Read. Engl.* 160, 2089–2101. <https://doi.org/10.1099/mic.0.078840-0>.
- Tsourkas, P.K., Yost, D.G., Krohn, A., LeBlanc, L., Zhang, A., Stamereilers, C., Amy, P.S., 2015. Complete Genome Sequences of Nine Phages Capable of Infecting *Paenibacillus larvae*, the Causative Agent of American Foulbrood Disease in Honeybees. *Genome Announc.* 3. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01120-15>.
- Versolovic, J., Schneider, M., de Bruijn, F., Lupski, J.R., 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in molecular and cellular biology* 5, 25–40.
- von der Ohe, W., 2016a. Amerikanische Faulbrut - Bekämpfungsstrategie in Niedersachsen (No. 63), Das Bieneninstitut Celle informiert. LAVES - Institut für Bienenkunde, Celle.

- von der Ohe, W., 2003. Control of American Foulbrood by using alternatively eradication method and artificial swarms. *Apiacta* 38, 137–139.
- von der Ohe, W., 2001. Prophylaxe der Amerikanischen Faulbrut: Untersuchung von Futterproben auf *Paenibacillus-larvae-larvae*-Sporen (No. 5), Das Bieneninstitut Celle informiert. Niedersächsisches Landesinstitut für Bienenkunde, Celle.
- Vosloo, J.A., Allsopp, M.H., Tait, T., Troskie, A.M., Rautenbach, M., 2015. Toxicity testing of the tyrocidines, cyclic antimicrobialpeptides isolated from *Bacillus aneurinolyticus*, toward African honeybees, *Apis mellifera scutellata*.
- Vosloo, J.A., Beims, H., Allsopp, M.H., Rensburg, W. van, Ohe, W. von der, Steinert, M., Rautenbach, M., 2017. Tolerance of honey bee adults and larvae toward tyrothricin peptides derived from *Brevibacillus parabrevis*. *Apidologie* 48, 833–844. <https://doi.org/10.1007/s13592-017-0528-0>.
- Weinbauer, M.G., 2004. Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiol. Rev.* 28, 127–181. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2003.08.001>.
- Weiß, K., 2003. Der Wochenendimker, 12th ed. Franckh-Kosmos Verlags-GmbH & Co.KG, Stuttgart.
- White, G.F., 1906. The bacteria of the apiary with special reference to bee disease. USDA Bur. Entomol. Tech. Ser. 14, 1–50.
- Yue, D., Nordhoff, M., Wieler, L.H., Genersch, E., 2008. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) analysis of the interactions between honeybee larvae and *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood of honeybees (*Apis mellifera*). *Environ. Microbiol.* 10, 1612–1620. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01579.x>.
- Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., van 't Riet, K., 1990. Modeling of the bacterial growth curve. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1875–1881.

## 8.2 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
$\Delta$	Deletionsmutante des folgenden Gens
1n	Haploider Chromosomensatz
2n	Diploider Chromosomensatz
16S rRNA	rRNA der 30S Untereinheit prokaryotischer Ribosomen
AFB	Amerikanische Faulbrut
Amp	Ampicillin
bp	Basenpaare (base pairs)
BHI	Brain-Heart-Infusion-Medium
BMMP	Basalmedium für <i>M. plutonius</i>
CA	Columbia-Agar
CDS	Coding sequence
cfu	Colony forming unit
Cm	Chloramphenicol
CNA	CSA
CSA	Columbia-Schafblut-Agar
Da	Dalton (Molekulargewicht)
DC	Dünnschichtchromatographie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxy-Nukleosidtriphosphate
DSM“x“	Von der DSMZ vergebene ID-Nummer des Stammes
DSMZ	Leibniz-Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
d <sub>x</sub>	Tag „x“ der Entwicklung/Lebenszeit von <i>A. mellifera</i>
EFB	Europäische Faulbrut
ERIC	Genotypen von <i>P. larvae</i> , Unterscheidung anhand der Muster unter Verwendung von ERIC-Primern in repPCR
<i>g</i>	x-fache Erdbeschleunigung
GS	Gramicidin
HZI	Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
Km	Kanamycin
LAVES IB CE	Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit – Institut für Bienenkunde Celle
LB	Kuria-Bertani-Medium
LD	Loading Dye
Lfd.-Nr.	Fortlaufende Nummerierung
LMG	BCCM/LMG Belgian Co-ordinated Collections of Microorganismsm
LPS	Lipopolysaccharide
LT <sub>100</sub>	Latale Zeit, zu der 100% der infizierten Individuen verenden
max.	Maximal(e)
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MilliQ	Doppelt deionisiertes Wasser, MilliQ-Anlage
MOI	Multiplicity of Infection
MYPGP	Medium zur Kultivierung von <i>P. larvae</i>
n.d.	Nicht datiert
NRP	Nichtribosomales Peptid
NRPS	Nichtribosomale Peptidsynthetase
nt	Nukleotid

---

OD <sub>595</sub>	
OD <sub>600</sub>	
OECD/OCDE	Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung
o.g.	Oben genannt
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS-Puffer)
PCR	Polymerase Chain Reaktion (Polymerase-Kettenreaktion)
pfu	Plaques forming unit
p.i.	Post infectionem
PKS	Polyketidsynthase
PM	Peritrophische Matrix
qPCR	Quantitative PCR
R	Resistenz gegenüber einem Antibiotikum
REM	Rasterelektronenmikroskop
repPCR	PCR repetitive im Gnom vorkommender Elemente
R <sub>f</sub> -Wert	Retentionsfaktor
RG	Reagenzglas
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur (20 °C)
SC	Säulenchromatographie
SDS	Natriumlaurylsulfat
SEM	Standard Error of the Mean (Standardfehler)
SMMP	Medium im Rahmen der Protoplastenherstellung
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
T <sub>E</sub>	Tyrothricin (Extrakt)
TE	TRIS-EDTA-Puffer
TEM	Transelektronenmikroskop
Tet	Tetracyclin
TM	TRIS-Mg <sup>2+</sup> -Puffer
Trcs	Tyrothricine
TrC <sub>Mix</sub>	Tyrothricin (weniger stark aufgereinigt als T <sub>E</sub> )
ÜN	Über Nacht (16 h)
WT	Wildtyp
XAD	Adsorberharz zur Isolation von Sekundärmetaboliten
X-Gal	5-Brom-4chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid
x Vol.	x-faches Volumen

---

### 8.3 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Klinische Symptome einer AFB Infektion. Dargestellt ist ausschnittsweise das löchrige Brutnest mit eingefallenen Zelldeckeln (grüne Pfeile) und die fadenziehende Masse im Rahmen der sog. Streichholzprobe (roter Pfeil). 16
- Abbildung 2: Verwendete DNA- und Proteinmarker. A, GeneRuler™ 1kb DNA Ladder; B, GeneRuler™ High Range DNA Ladder; C, PageRuler Prestained Protein Ladder. Quelle: [www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com). 26
- Abbildung 3: Fragmentmuster der Referenzstämme von *P. larvae* nach Amplifikation in der rep-PCR mit ERIC-Primern. M, GeneRuler 1kb DNA Ladder; 1, *P. larvae* ERIC I (DSM 7030); 2, *P. larvae* ERIC II (DSM 25430); 3, *P. larvae* ERIC III (LMG 16252); 4, *P. larvae* ERIC IV (LMG 16247); 5, *P. larvae* ERIC V (DSM 106052); >, Hinweis auf abweichendes Fragment zum Muster des Genotypen ERIC I. 49
- Abbildung 4: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von *P. larvae*. A, Spore ERIC I (DSM 7030); B, Spore ERIC II (DSM 25430); C, Spore ERIC III (LMG 16252); D, Spore ERIC IV (LMG 16247); E, Spore ERIC V (DSM 106052); F, vegetative Zelle ERIC IV (LMG 16247). 51
- Abbildung 5: PCR-Produkte der Genotypen ERIC I-V von *P. larvae* zur Überprüfung auf Gene des Paenilarvin-Operons. A, ituD; B, ituA; C, ituB; D, ituC. Probenauftrag: m, GeneRuler 1kb DNA Ladder; M, GeneRuler High Range DNA Ladder; 1, *P. larvae* ERIC I (DSM 7030); 2, *P. larvae* ERIC II (DSM 25430 via HZI); 3, *P. larvae* ERIC II (DSM 25430 via DSMZ); 4, *P. larvae* ERIC III (LMG 16252); 5, *P. larvae* ERIC IV (LMG 16247); 6, *P. larvae* ERIC V (DSM 106052). 53
- Abbildung 6: Mortalität der Brut von *A. mellifera* nach oraler Verabreichung von 2,5 µg (A), bzw. 5,0 µg (B) Paenilarvin an d<sub>4</sub> der Larvalentwicklung. Die Verabreichung erfolgte an d<sub>4</sub> an uninfizierte Larven, die Kontrolle erhielt keine Futterzusätze. Als Referenz wurden Larven an d<sub>1</sub> (t = 0 d p.i.) mit 500 Sporen des Genotypen ERIC II (DSM 25430) infiziert. 56
- Abbildung 7: Mortalität von *A. mellifera* nach Infektion mit *P. larvae* im L1-Stadium (500 Sporen/Larve). A, häufig auftretende Genotypen (ERIC I und II); B, selten auftretende Genotypen (ERIC III-V). 57
- Abbildung 8: Zunahme der Mortalität von *A. mellifera*-Larven nach der Verabreichung von T<sub>E</sub> an d<sub>4</sub>. Mortalität [%] ± SEM. Signifikanzen: n.S., nicht signifikant (p > 0,1); ●, grenzwertig signifikant (0,1 > p > 0,05); \*, signifikant (0,05 > p > 0,01); \*\*, stark signifikant (0,01 > p > 0,001); \*\*\*, hochgradig signifikant (p < 0,001). A, Mortalität an d<sub>5</sub>; B, Mortalität an d<sub>6</sub>; C, Mortalität an d<sub>7</sub>. 61
- Abbildung 9: Zunahme der Mortalität von *A. mellifera*-Larven nach der Verabreichung von T<sub>Mix</sub> an d<sub>4</sub>. Mortalität [%] ± SEM. Signifikanzen: n.S., nicht signifikant (p > 0,1); ●, grenzwertig signifikant (0,1 > p > 0,05); \*, signifikant (0,05 > p > 0,01); \*\*, stark signifikant (0,01 > p > 0,001); \*\*\*, hochgradig signifikant (p < 0,001). A, Mortalität an d<sub>5</sub>; B, Mortalität an d<sub>6</sub>; C, Mortalität an d<sub>7</sub>. 62
- Abbildung 10: Mortalität der Bienenbrut im Therapieversuch mit den Trcs T<sub>E</sub> und T<sub>Mix</sub> bei Infektion mit *P. larvae* ERIC I (A) und ERIC II (B). Infektion der Larven an d<sub>0</sub> mit 500 Sporen/Larve. Applikation der Trcs (T<sub>E</sub>=1,83 µg/Larve, T<sub>Mix</sub>=0,61µg/Larve) an d<sub>4</sub>. Die Kontrolle stellt die Mortalität gesunder Larven ohne Applikation der Trcs dar. 63
- Abbildung 11: Transelektronenmikroskopische Aufnahme der Bakteriophagenisolate nach Negativkontrastierung. A, Schematische Darstellung eines Bakteriophagen aus der Familie der Siphoviridae; B, Bakteriophage HB1; C, Bakteriophage HB2; D, Bakteriophage HB4;

- E, Bakteriophage HB10c2; F, Bakteriophage HB12; G, Bakteriophage HB13; H, Bakteriophage HB16; I, Bakteriophage HB-A; J, Bakteriophage HB $\chi$ ; K, Bakteriophage HB-Wf. 67
- Abbildung 12: Vergleich der Genomstrukturen der Bakteriophagen HB10c2 und phiIBB\_PI23. Farbliche Markierung der funktionellen Cluster: orange, Verpacken von DNA; rot, Strukturgene; blau, Replikationsgene; gelb, Gene zur Wirtszelllyse; grün, an der Lyse beteiligte Gene. 68
- Abbildung 13: Restriktionsmuster der Phagen-DNA nach Restriktion mit BamHI (A) und KpnI (B). M, GeneRuler 1kb DNA Ladder; 1, Bakteriophage HB1; 2, Bakteriophage HB2; 4, Bakteriophage HB4; 12, Bakteriophage HB12; 13, Bakteriophage HB13; 16, Bakteriophage HB16; A, Bakteriophage HB-A; X, Bakteriophage HB $\chi$ ; W, Bakteriophage HB-Wf. Fragmentcluster mit mehreren Bakteriophagen wurden durch Klammern verdeutlicht: grün, Cluster-Typ<sub>3</sub>; orange, Cluster-Typ<sub>4</sub>; blau, Cluster-Typ<sub>5</sub>. 69
- Abbildung 14: Restriktionsmuster der Phagen-DNA nach kombiniertem Restriktionsverdau mit BamHI und KpnI (A) und der DNA des Bakteriophagen HB10c2 mit BamHI oder KpnI (B). M, GeneRuler 1kb DNA Ladder; 1, Bakteriophage HB1; 2, Bakteriophage HB2; 4, Bakteriophage HB4; 12, Bakteriophage HB12; 13, Bakteriophage HB13; 16, Bakteriophage HB16; A, Bakteriophage HB-A; X, Bakteriophage HB $\chi$ ; W, Bakteriophage HB-Wf; a, Bakteriophage HB10c2 + BamHI; b, Bakteriophage HB10c2 + KpnI. Fragmentcluster-Typen mit mehreren Bakteriophagen wurden durch Klammern verdeutlicht: grün, Cluster-Typ<sub>3</sub>; orange, Cluster-Typ<sub>4</sub>; blau, Cluster-Typ<sub>5</sub>. 70
- Abbildung 15: Nachweis der Integrase-Sequenz (A) und N-acetylmuramoyl-L-alanin-Amidase-Sequenz (B) aus HB10c2 in verschiedenen Phagenisolaten. M, Marker (GeneRuler 1kb DNA Ladder); 1, Bakteriophage HB1; 2, Bakteriophage HB2; 4, Bakteriophage HB4; 12, Bakteriophage HB12; 13, Bakteriophage HB13; X, Bakteriophage HB $\chi$ ; -, Negativkontrolle. 71
- Abbildung 16: Nachweis der putativen  $\beta$ -Lactamase-Sequenzen aus HB10c2 in verschiedenen Phagenisolaten über das Amplifikat der Basen 6.154 – 6.492 (A) und 44.971 – 45.219 (B). M, Marker (GeneRuler 1kb DNA Ladder); 1, Bakteriophage HB1; 2, Bakteriophage HB2; 4, Bakteriophage HB4; 12, Bakteriophage HB12; 13, Bakteriophage HB13; X, Bakteriophage HB $\chi$ ; -, Negativkontrolle. 72
- Abbildung 17: Schematische Darstellung der phylogenetischen Beziehungen zwischen den Bakteriophagenisolaten basierend auf den Ergebnissen der Restriktionsanalysen. Die Balkenlänge entspricht keiner phylogenetischen Distanz. 72
- Abbildung 18: SDS-PAGE der Phagen-Ghostpartikel nach Silberfärbung. M, Marker; 1, Bakteriophage HB1; 2, Bakteriophage HB1; 3, Bakteriophage HB2; 4, Bakteriophage HB4; 5, Bakteriophage HB12; 6, Bakteriophage HB13; 7, Bakteriophage HB16; 8, Bakteriophage HB $\chi$ ; 9, Bakteriophage HB-Wf. 76
- Abbildung 19: Behandlung der mit *P. larvae* ERIC I (A), bzw. ERIC II (B) infizierten und mit dem Bakteriophagen HB10c2 therapierten Bienenlarven. Infektion (500 Sporen/Larve) und Applikation des Bakteriophagen HB10c2 (50.000 pfu/Larve) erfolgten an d1 (t = 0 d p.i.). 77
- Abbildung 20: Infektion von *A. mellifera*-Larven mit reisolierten *P. larvae*-Sporen aus therapierter Bienenbrut mit dem Bakteriophagen HB10c2. Die Infektion der Larven erfolgte mit den Genotypen ERIC I (A) und ERIC II (B) zu je 500 Sporen/Larve an d1 (t = 0 d p.i.). Die Vergleichswerte zur Infektion stammen aus den vorangegangenen Therapieversuchen. 78
- Abbildung 21: Behandlung der mit *P. larvae* ERIC I (A), bzw. ERIC II (B) infizierten und mit dem Bakteriophagen HB $\chi$  therapierten Bienenlarven. Infektion (500 Sporen/Larve) an d<sub>1</sub> (t = 0 d p.i.) und Applikation des Bakteriophagen HB10c2 (50.000 pfu/Larve) an d<sub>1</sub>+d<sub>3</sub>-d<sub>5</sub>. 79
- Abbildung 22: Gegenüberstellung der drei Killertypen von *P. larvae*. Slow Killer, ERIC I; Moderate Killer, ERIC II; Fast Killer, ERIC III-V. 83

Abbildung 23: Populationsmodell des relativen Vorkommens von *A. mellifera*, *P. larvae* und *P. larvae*-spezifischem Bakteriophage. Die Grafik stellt verschiedene Formen der drei betrachteten Organismen im Jahreszeitlichen Verlauf dar. 96

## 8.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte.	20
Tabelle 2: Spezielle Verbrauchsmaterialien.	21
Tabelle 3: Verwendete Bakterienstämme.	21
Tabelle 4: Verwendete Bakteriophagen.	23
Tabelle 5: Verwendete Vektoren.	23
Tabelle 6: Verwendete Enzyme.	23
Tabelle 7: Verwendete Oligonukleotide (Primer).	24
Tabelle 8: Zusammensetzung des Brain-Heart-Infusion-Mediums.	27
Tabelle 9: Zusammensetzung des Basalmediums für <i>M. plutonius</i> (BMMP).	27
Tabelle 10: Zusammensetzung des Luria-Bertani Mediums.	27
Tabelle 11: Zusammensetzung des SMMP-Mediums.	29
Tabelle 12: Zusammensetzung des Columbia-Agars (CA).	30
Tabelle 13: Zusammensetzung des TM-Puffers.	31
Tabelle 14: Zusammensetzung des TE-Puffers.	33
Tabelle 15: Zusammensetzung der Medien für die Isolation und Kultivierung von primären Darmepithelzellen aus <i>A. mellifera</i> .	35
Tabelle 16: Zusammensetzung des TAE-Puffers.	36
Tabelle 17: Zusammensetzung des LD-Puffers.	37
Tabelle 18: Zusammensetzung des CR5-Agars.	40
Tabelle 19: Zusammensetzung der Medien für die Transformation von <i>P. larvae</i> .	41
Tabelle 20: Zusammensetzung der Komponenten für die SDS-PAGE.	42
Tabelle 21: Zusammensetzung der Coomassie Silver-Blue Färbelösung.	42
Tabelle 22: Zusammensetzung der Lösung für die SDS-Silberfärbung.	42
Tabelle 23: Zusammensetzung des mH-Mediums.	44
Tabelle 24: Zusammensetzungen der Futterlösungen für den <i>in vivo</i> -Larvenassay.	45
Tabelle 25: Zusammenfassung der <i>P. larvae</i> -positiven Honigproben der Untersuchungen zur Abundanz der verschiedenen Genotypen (ERICs).	48
Tabelle 26: Ergebnisse zur Detektion von NRPS-Syntheseclustern in den Genomen der Genotypen ERIC I-V von <i>P. larvae</i> .	52
Tabelle 27: Zusammenfassung der akuten Paenilarvin-Fütterung im <i>in vivo</i> -Larvenassay.	55
Tabelle 28: Biologische Aktivität des Trcs T <sub>E</sub> gegenüber bakteriellen Bienenpathogenen und den kommensalen Erregern der EFB. MHK, minimale Hemmkonzentration; SEM, Standardfehler des Mittelwertes.	58
Tabelle 29: Biologische Aktivität des Trcs T <sub>E</sub> gegenüber Vertretern des bakteriellen Mikrobioms der Honigbiene. MHK, minimale Hemmkonzentration.	59
Tabelle 30: Kontrollmortalität der <i>A. mellifera</i> -Larven zur Methodvalidierung der akuten Giftfütterung (OECD/OCDE TG 237, 2012). SEM, Standardfehler des Mittelwertes.	60
Tabelle 31: Zusammenfassung der statistischen Auswertung der akuten Giftfütterung von T <sub>E</sub> an <i>A. mellifera</i> -Larven.	61
Tabelle 32: Zusammenfassung der statistischen Auswertung der akuten Giftfütterung von T <sub>Mix</sub> an <i>A. mellifera</i> -Larven.	62
Tabelle 33: Mortalität der <i>A. mellifera</i> -Larven vor Verabreichung der Trcs im <i>in vivo</i> -Therapieversuch. SEM, Standardfehler des Mittelwertes. Signifikanzen: n.S., nicht signifikant	



- ( $p > 0,1$ ); ●, grenzwertig signifikant ( $0,1 > p > 0,05$ ); \*, signifikant ( $0,05 > p > 0,01$ ); \*\*, stark signifikant ( $0,01 > p > 0,001$ ); \*\*\*, hochgradig signifikant ( $p < 0,001$ ). 64
- Tabelle 34: Mortalität der *A. mellifera*-Brut im in vivo-Therapieversuch. SEM, Standardfehler des Mittelwertes. Signifikanzen: n.S., nicht signifikant ( $p > 0,1$ ); ●, grenzwertig signifikant ( $0,1 > p > 0,05$ ); \*, signifikant ( $0,05 > p > 0,01$ ); \*\*, stark signifikant ( $0,01 > p > 0,001$ ); \*\*\*, hochgradig signifikant ( $p < 0,001$ ). 64
- Tabelle 35: Ergebnisse der Restriktionsverdaue der Phagen-DNA zur Erstellung phylogenetischer Cluster-Typen. 70
- Tabelle 36: Lytische Aktivität der Bakteriophagenisolate gegenüber verschiedenen *P. larvae*-Isolaten. +, lytische Aktivität; -, keine lytische Aktivität. 73
- Tabelle 37: Lytische Aktivität der Bakteriophagenisolate gegenüber verschiedenen Bakterien. A, Mikrobiom *A. mellifera*-Larve; B, Mikrobiom *A. mellifera*-Imago; C, ubiquitäre Bacillales; +, lytische Aktivität; -, keine lytische Aktivität. 74

## 8.5 Formelverzeichnis

- Formel 1: Modell zur Visualisierung der nicht-linearen Regression in einer Sättigungskurve.  $N_0$ , Anfangswert; K, Kapazitätsgrenze; r, Wachstumsrate; t, Zeit. 31
- Formel 2: Modell zur Berechnung der Generationszahl einer Bakterienkultur.  $G_{P. larvae}$ , Generationszahl des Wirtes (*P. larvae*);  $cfu_0$ , Zellzahl der *P. larvae* zu  $t=0$  (Inokulum);  $cfu_t$ , Zellzahl der *P. larvae* an Zeitpunkt t. 32
- Formel 3: Modell zur Berechnung der Generationszahl eines Wirtes unter Einbeziehung der pfu eines Bakteriophagen in einer Co-Kultur.  $G_{P. larvae}$ , Generationszahl des Wirtes (*P. larvae*) an Zeitpunkt t;  $pfu_0$ , pfu des Bakteriophagen zu  $t=0$  (Inokulum);  $pfu_t$ , pfu des Bakteriophagen an Zeitpunkt t. 32
- Formel 4: Bestimmung des Retentionsfaktors einer Rohextrakt-Komponente.  $R_t$ , Retentionsfaktor;  $S_{Komponente}$ , Wanderungstrecke der Komponente durch Visualisierung festgestellt;  $S_{Laufmittel}$ , Wanderungstrecke Laufmittel. 43